



Université de Montréal

**Élaboration d'un bioessai à haut débit pour la découverte de nouveaux ligands  
péptidiques chez les végétaux**

par

Mohamad Gabriel Alameh

Département de Sciences Biologiques

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade  
de Maître es (M.Sc.) en sciences biologiques

Mai, 2010

© Mohamad Alameh,

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Élaboration d'un bioessai à haut débit pour la découverte de nouveaux ligands  
péptidiques chez les végétaux**

Présenté:

Mohamad Gabriel Alameh

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Mario Cappadocia, président-rapporteur  
Daniel Philippe Matton, directeur de recherche  
Mario Jolicoeur, membre du jury

## Résumé

Suite au projet de séquençage du génome *d'Arabidopsis thaliana*, plus de 400 récepteurs de types serine/thréonine kinases (*Protein Receptor Kinase* ou PRK) ont été prédits. Par contre, seulement sept paires de récepteurs/ligands ont été caractérisées jusqu'à présent par des techniques de biochimie et d'analyse, de mutants. Parmi ceux-ci figurent les PRK : BRI1, CLV1, SRK, SR160, Haesa-IDA et PEPR1 qui jouent un rôle important dans le développement, l'auto-incompatibilité sporophytique et les mécanismes de défense. Le but de mon projet de maîtrise était de développer un bioessai à haut débit qui permettra la découverte de ligands peptidiques. Le bioessai utilisera des PRK chimériques composés du domaine extracellulaire (l'ectodomaine) de la PRK à l'étude fusionnée au domaine intracellulaire d'une PRK qui agira comme rapporteur. Deux stratégies sont présentement développées dans notre laboratoire : la première consiste à fusionner la PRK à l'étude avec le domaine intracellulaire (l'endodomaine) du récepteur tyrosine kinase animal EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). Suite à l'interaction avec une fraction protéique contenant un ligand correspondant à la PRK étudiée, une transphosphorylation de l'endodomaine (le domaine kinase) serait détectable. La seconde stratégie utilise l'endodomaine du récepteur BRI1, un récepteur répondant aux brassinostéroïdes. Suite à l'interaction avec une fraction protéique contenant un ligand correspondant à la PRK étudiée, cette fois-ci nous devrions être en mesure de mesurer l'activation d'un gène rapporteur répondant normalement à une activation par les brassinostéroïdes.

**Mots-clés :** Bioessai, Récepteur serine/thréonine kinase, ligands peptidiques, gènes rapporteurs, BRI1, SRK<sub>6</sub>, EGFR, dimérisation, interaction ligand-récepteur, domaine extracellulaire, protéines chimériques, PCR en temps réel, protoplastes, expression transitoire, expression protéique.



## Abstract

The complete sequence of the genome of *Arabidopsis thaliana* was achieved in year 2000 and has resulted in the prediction of more than 400 receptor serine/threonine kinase or Plant Receptor Kinase (PRK). Despite this tremendous work, only seven pairs of ligand/receptor have been characterized through conventional techniques such as mutant analysis and biochemical characterization. These receptors have been found to play an important role in plant defense (SP160), development (BRI1, CLV1) and sporophytic auto-incompatibility (SRK). The aim of the project was to develop a high throughput bioassay in order to find new ligands for known receptors. In order to do so, the bioassay will use chimeric protein technology, by fusing the ectodomain of a receptor to a known endodomain. The latter will play the role of a reporter. Two strategies were developed in our laboratory and are being tested. The first strategy is to fuse the ectodomain of an unknown PRK to the phylogenetically unrelated kinase domain of the animal Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). When tested with a crude protein extract containing the specific ligand of the unknown PRK, a transphosphorylation should occur and be detected. The second strategy will use the endodomain of BRI1 as a reporter, a receptor responding to the brassinosteroid phytohormone, which will relay the message to a second construct used as a reporter gene once the ligand has bound the PRK ectodomain fused to the BRI1 endodomain.

**Keywords:** Receptor kinase, ligand, real-time PCR, BRI1, SRK<sub>6</sub>, EGFR, receptor dimerisation, chimeric proteins, extra cellular domain, ligand-receptor interaction, protoplast, protein expression.

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract .....	iv
Liste des figures .....	x
Remerciements.....	xiv
1. Introduction.....	1
1.1. Structure des récepteurs kinases.....	6
1.1.1 Le domaine extracellulaire.....	6
1.1.2. Le domaine intracellulaire.....	8
1.1.3. Le domaine kinase .....	10
1.1.4. Le domaine C-terminal .....	11
1.2. Mode d'action des PRK .....	13
1.2.1. Le récepteur BRI1 et sa régulation.....	13
1.2.3. Le récepteur SRK et sa régulation .....	18
1.3. Mode d'action des récepteurs chez les animaux .....	24
1.3.1. Le récepteur EGFR et sa régulation.....	24
1.4. Techniques d'identification des ligands orphelins.....	27
1.4.1. Expression screening ou phage display.....	27
1.4.2. Système à double ou à triple hybride .....	29
1.4.3. Immunoprécipitation .....	29
1.4.4. Bioessai .....	30
1.4.5. Biosenseur .....	31
1.5. Présentation du projet de recherche .....	34
2. Matériel et Méthodes.....	36
2.1. Construction des plasmides.....	36
2.1.1. Clonage de BRI1 dans pBlue Script II (+).....	36
2.1.2. Séquençage de BRI1 .....	36

2.2. Clonage des promoteurs BL induits et des chimères .....	37
2.2.1. La réaction BP.....	37
2.2.2. La réaction LR.....	37
2.2.3. Sélection et séquençage.....	38
2.3. Mini préparation d'ADN.....	38
2.3.1. Extraction au phénol chloroforme.....	39
2.4. Transformation des souches bactériennes <i>E coli</i> (Top10) et <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (C58C1).....	39
2.5. Génotypage des plantes <i>Brassica</i> S <sub>6</sub> S <sub>6</sub> et S <sub>13</sub> S <sub>13</sub> .....	40
2.5.1. Méthode de Southern .....	40
2.5.2. Migration et Hybridation sur membrane.....	41
2.6. Production des protéines SCR <sub>6</sub> et SCR <sub>13</sub> .....	42
2.7. Purification des protéines SCR <sub>6</sub> et SCR <sub>13</sub> .....	44
2.7.1. Migration sur gel SDS-PAGE et Transfert sur membrane .....	44
2.7.2. Western Blot .....	44
2.8. Biotest d'activité des protéines SCR <sub>6</sub> et SCR <sub>13</sub> .....	45
2.8.1. Biotest .....	45
2.8.2. Fixation des fleurs.....	45
2.8.3. Coloration au bleu d'aniline.....	46
2.9. qPCR des gènes BL induits.....	46
2.9.1. Design de l'essai .....	46
2.9.2. Extraction de l'ARN .....	47
2.9.3. Réaction de reverse transcription.....	48
2.9.4. qPCR .....	49
2.10. Expression des gènes rapporteurs .....	50
2.10.1. Agro-infiltration des constructions promoteurs : GUS dans <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	50
2.10.2. Essai enzymatique de l'activité GUS.....	50
3. Résultats .....	52

3.1. Induction de SCR <sub>6</sub> et SCR <sub>13</sub> .....	52
3.1.1 Optimisation de l'induction .....	52
3.1.2. Choc osmotique.....	53
3.2. Purification de SCR <sub>6</sub> et SCR <sub>13</sub> .....	54
3.3. Génotypages des plantes <i>Brassica oleracea</i> S <sub>6</sub> S <sub>6</sub> et S <sub>13</sub> S <sub>13</sub> .....	61
3.4. Biotest d'activité .....	65
3.5. Quantification des gènes induits aux brassinolides.....	70
3.5.1. Identifications des gènes induits aux brassinolides.....	70
3.5.2. Quantification des gènes induits aux brassinolides.....	75
3.6. Construction des promoteurs : rapporteurs .....	77
3.6.1. Amplification des séquences promotrices et clonage dans le vecteur pMDC162 .....	77
3.7. Tests d'activité des promoteurs : rapporteurs .....	81
3.7.1. Tests d'activités des promoteurs : rapporteurs transformés dans le système d'expression de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	81
3.8. Clonage du gène BRI1 dans le vecteur pBlueScriptII (+).....	84
3.8.1. Amplification et clonage du gène BRI1 dans pBlueScriptII (+).....	84
3.9. Construction des chimères SRK <sub>6</sub> : BRI 1 et SRK <sub>6</sub> : EGFR .....	87
3.9.1. Analyse bioinformatique et clonage des chimères.....	87
3.9.2. Clonage des chimères.....	88
3.10. Expression des chimères .....	94
4. Discussion .....	96
4.1. Production, purification et activité des protéines SCR .....	97
4.1.1. Production et purification des protéines SCR.....	97
4.1.2. Bioactivité des protéines SCR.....	98
4.2. Gènes surexprimés par la voie des brassinolides et construction des promoteurs : rapporteurs .....	99
4.3. Construction des chimères et expression .....	101
5. Perspective d'avenir.....	103

Bibliographie..... i

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Résumé des principaux récepteurs kinases chez les plantes.....	5
<b>Tableau 2 :</b> Tableau récapitulatif des différentes concentrations d'arabinose utilisées lors de l'expression pilote des protéines SCR <sub>6</sub> et SCR <sub>13</sub> . La concentration d'induction optimale a été retenue pour l'expression de ces protéines recombinantes.....	43
<b>Tableau 3 :</b> Séquences des amorces, noms des gènes et numéros des sondes UPL utilisées dans l'essai qPCR.....	47
<b>Tableau 4 :</b> Recette 1. Les différentes composantes de la réaction TaqMan® utilisées pour les gènes sauf pour le gène At2g21200.....	49
<b>Tableau 5 :</b> Recette 2. Les différentes composantes de la réaction SYBRGreen® utilisées pour le gène At2g21200.....	49
<b>Tableau 6 :</b> Tableau résumant les résultats du biotest d'activité des protéines recombinantes SCR <sub>6</sub> et SCR <sub>13</sub> . ....	68
<b>Tableau 7 :</b> Tableau comparatif des gènes surexprimés par la voie des brassinostéroïdes selon les études de Goda et al et ceux de Müssig et al. Non applicable = N/A. ....	72

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Structure d'un récepteur kinase archétype. ....	12
<b>Figure 2 :</b> Model de la cascade de signalisation du récepteur BRI1. ....	17
<b>Figure 3 :</b> Modèle de la cascade de signalisation du récepteur SRK. ....	23
<b>Figure 4 :</b> Schématisation de la technique du phage display. ....	28
<b>Figure 5 :</b> Illustration du principe de la SPR ( <i>surface plasmon resonance</i> ). A) Schéma du principe de la SPR. B) Cinétique de liaison d'un ligand à son récepteur. C) Représentation de la matrice, du couplage et des différents types de liaison. Image adaptée du site web <a href="http://www.rci.rutgers.edu">www.rci.rutgers.edu</a> . ....	33
<b>Figure 6 :</b> Schématisation des deux stratégies utilisées pour le développement du bioessai. ....	35
<b>Figure 7 :</b> Optimisation des concentrations d'induction des bacteries TOP10 transformées avec la construction pBADgIII :SCR <sub>6</sub> . Gel SDS-PAGE des protéines totales 4h post-induction avec différentes concentrations d'arabinose. E= échelle ....	56
<b>Figure 8 :</b> Optimisation des concentrations d'induction des bacteries TOP10 transformées avec la construction pBADgIII :SCR <sub>13</sub> . Gel SDS-PAGE des protéines totales 4h post-induction avec différentes concentrations d'arabinose. E= échelle. ....	57
<b>Figure 9 :</b> Immunobuvardage de type western des protéines SCR <sub>6</sub> et SCR <sub>13</sub> retrouvées dans le culot bactérien et dans le surnageant suite au choc osmotique. A et C = surnageant. B et D = culot. ....	58
<b>Figure 10 :</b> Électrophorèse sur gel SDS-PAGE des différentes fractions du surnageant suite au choc osmotique. L= échelle. C= contrôle (bactérie non transformée). F1 et F4= après ajout de la solution B (20 mM Tris-HCl, 2.5 mM EDTA). F2 et F3= après ajout de la solution A (20 mM Tris-HCl, 2.5 mM EDTA, 20% sucrose). Les solutions A et B ont été ajoutées afin d'induire un choc osmotique des cellules. ....	59
<b>Figure 11 :</b> Immunobuvardage de type Western des cellules TOP10 transformées avec pBADgIII/SCR <sub>6</sub> et pBADgIII/SCR <sub>13</sub> suite à un choc osmotique. ....	60

- Figure 12 :** Gènotypage des plantes ayant l'haplotype  $S_6S_6$  par la méthode de Southern. La sonde radioactive utilisée est spécifique à la séquence du gène codant pour le récepteur  $SRK_6$ . ..... 63
- Figure 13 :** Gènotypage des plantes ayant l'haplotype  $S_{13}S_{13}$  par la méthode de Southern. L'ADN génomique des plantes *Brassica*  $S_{13}S_{13}$  a été digéré avec l'enzyme de restriction EcoRI. La sonde radioactive utilisée lors de l'hybridation sur membrane est spécifique à la séquence du gène codant pour la protéine  $SCR_{13}$ . ..... 64
- Figure 14 :** Génération de graines à partir de lignées auto-incompatibles de *Brassica*. A) Plantes matures à différents stades de développement stigmatique. Le stade -1 correspond au stade de développement le moins évolué tandis que le stade 1 correspond au stade de développement où le stigma est auto-incompatible. B) Silique issue d'un croisement auto-incompatible  $S_6S_6 \times S_6S_6$  démontrant ainsi l'auto-incompatibilité de ces plantes. C) Graines issues d'un croisement  $S_6S_6 \times S_6S_6$ . Les stigmas immatures (Stade-1) de plantes auto-incompatibles  $S_6S_6$  ont été pollinisées avec du pollen  $S_6S_6$  provenant de pistils matures. .... 67
- Figure 15 :** Bioessai d'activité de protéines recombinantes  $SCR_6$  et  $SCR_{13}$ . A)  $rSCR_6$  + stigma  $S_6S_6$  + Pollen  $S_{13}S_{13}$ . B)  $rSCR_{13}$  + stigma  $S_{13}S_{13}$  + Pollen  $S_6S_6$ . C)  $S_6S_6$  + Pollen  $S_{13}S_{13}$ . D)  $S_{13}S_{13}$  + Pollen  $S_6S_6$ .  $rSCR = SCR$  recombinant ..... 69
- Figure 16 :** Méta-analyse des cinq gènes choisis selon l'étude de Goda et *al.* face aux différents stimuli. Les données de méta-analyse ont été générées par le logiciel Genevestigator® en utilisant des bases de données issues d'études de biopuces à ADN. .... 73
- Figure 17 :** Expression des cinq gènes choisis à différents stade de développement chez *Arabidopsis thaliana*. A) Graines au stade de germination. B) Plantules. C) Jeunes rosettes. D) Boulting . E) Fleures..... 74
- Figure 18 :** Diagramme en battons de la surexpression relative des gènes sélectionnés et induits aux BLs. .... 76
- Figure 19 :** Amplification des promoteurs des cinq gènes induits aux BL par PCR en utilisant des amorces spécifiques aux régions (~ 1000 pb) en aval des gènes choisis. La



migration des produits de PCR est effectuée sur un gel 1%. A) 1Kb plus. B) At2g36220. C) At2g21200. D) At5g57560. E) At4g25810. F) At1g69490 ..... 79

**Figure 20 :** Analyse des clones pZeo : promoteurs positifs par cartographie de restriction et PCR diagnostique. A) Cartographie de restriction par MluI. B) PCR diagnostique sur les plasmides pZeo : promoteurs BL induits en utilisant des amorces séquences spécifiques. E= échelle; C = control (pZeo : promoteur amplifié avec les amorces spécifiques) ..... 80

**Figure 21 :** Tests d'activités des promoteurs : rapporteurs construits puis transformés dans le système d'expression de *Nicotiana benthamiana*. ..... 83

**Figure 22 :** Schématisation du gène BRI1 sur le chromosome 4. A) Régions génomiques et transcrit. B) Contexte génomique ..... 85

**Figure 23 :** Amplification du gène BRI1 à partir de l'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana* ..... 86

**Figure 24 :** Prédiction des régions transmembranaires des récepteurs SRK<sub>6</sub>, BRI1 et EGFR respectivement en utilisant le gratuitel TMHMM. A) SRK<sub>6</sub>. B) BRI1. C) EGFR..... 91

**Figure 25 :** Screening par hybridation sur membrane de PVDF des différentes chimères SRK<sub>6</sub>:BRI1 ..... 92

**Figure 26 :** Screening par hybridation sur membrane de PVDF des différentes chimères SRK<sub>6</sub>: EGFR..... 93

**Figure 27 :** Immunobuvardage de type western des différentes chimères SRK<sub>6</sub>: EGFR et SRK<sub>6</sub>: BRI1 exprimées dans le système *Nicotiana benthamiana*. A) SRK<sub>6</sub>: EGFR (647 :646 et 525 :600 respectivement). B) SRK<sub>6</sub>: BRI1 (447 :403 et 467 : 381 respectivement) ..... 95

*À ma mère*

*À Lily*

*À Mon père*

*Et surtout à mes deux grands-mères*

## Remerciements

En premier lieu, je voudrais remercier mon directeur de recherche, Dr **Daniel .P. Matton**, pour m'avoir encouragé et soutenu durant toute la durée de l'encadrement.

En second lieu, je voudrais remercier tous les membres du laboratoire spécialement :

**Dr Sabar** pour les belles discussions ainsi que pour la pause cigarette qu'il a abandonnée pour sa femme.

**Éric** pour son dynamisme inspirant et son intelligence,

**Josée** pour sa douceur,

**Faiza** pour son caractère de plomb qui nous inspire à être rigide,

**Édith** pour sa flexibilité et son sourire au laboratoire

Enfin, je voudrais remercier **Rachid** qui a pu supporter toutes les niaiseries comme on le dit en bon québécois.

En troisième lieu, je voudrais remercier **Emily-Jane Aouad** pour son aide tout au long de la période de correction du mémoire.

Je voudrais aussi mentionner combien le séjour au Québec m'a été salutaire et enrichissant et aimerais ajouter que la chaleur humaine que dégage la communauté québécoise a tissé dans mon cœur des attaches solides qui, je crois, seront gravées à jamais dans mon être.

# 1. Introduction

Les organismes biologiques complexes requièrent une coordination hautement évoluée, voire spécialisée, pour assurer un développement optimal au niveau de l'organisme lui-même ainsi qu'au niveau de l'évolution de l'espèce. Cette coordination se doit optimale surtout chez les organismes sessiles comme les plantes et se fait via la communication cellule-cellule et l'environnement-cellule. Une grande part de la perception des informations se fait par l'entremise des récepteurs cellulaires, par le biais de leur ectodomaine, et les transmet – informations – vers l'intérieur de la cellule via leur domaine kinase. Ces signaux peuvent être relayés au noyau par diverses formes de cascades de signalisation permettant la régulation de l'expression génique et une réponse adéquate de l'organisme face aux stimuli.

Selon les estimations bioinformatiques, le génome d'*Arabidopsis thaliana* compterait environ 620 récepteurs kinases (Shiu and Bleecker 2001; Shiu and Bleecker 2001). Par contre, seulement 417 seraient des récepteurs kinases de type sérine/thréonine ayant toutes les caractéristiques d'un récepteur membranaire archétypale : ectodomaine, domaine transmembranaire et endodomaine. Les autres, quoique phylogénétiquement reliés, ne possèdent pas d'ectodomaine et pourraient représenter une famille de récepteurs intracellulaires.

Parallèlement, les études bioinformatiques indiquent un nombre moins élevé chez l'espèce *Homo sapiens* dont le nombre de récepteurs kinases est de 90 et où 58 sont des récepteurs de type tyrosine kinase, un domaine absent chez les récepteurs de plantes (Robinson, Wu et al. 2000; Luan 2002; Manning, Cummins et al. 2002). Il faut toutefois noter que certains récepteurs chez les plantes démontrent une double spécificité, sérine/thréonine et tyrosine kinase, comme ZmPRK1 et SERK (Mu, Lee et al. 1994; Shah, Vervoort et al. 2001).

Les 58 récepteurs tyrosines kinases (RTK) de l'espèce *Homo sapiens* sont groupés en 20 sous-familles selon la séquence du domaine kinases (Robinson, Wu et al. 2000), tandis que les récepteurs kinases de plantes (PRK) sont divisés en 44 sous-familles selon la phylogénie du même domaine (Shiu and Bleecker 2001; Shiu and Bleecker 2001). Or, si nous nous basons sur leurs domaines ou motifs extracellulaires, la classification des PRK résulte en une division en 21 classes structurales. Bien qu'il existe près d'une quinzaine de domaines extracellulaires chez les plantes (lectine, EGF, LysM, S-domain, Wak-like, etc.), le domaine *Leucine Rich Repeat* (LRR) est le plus abondant (~50%) et est présent chez 216 PRK chez *Arabidopsis thaliana* divisés en 13 sous-familles (LRR I à XIII). Ce domaine est connu pour jouer un rôle important dans les interactions protéines-protéines et protéine-ligands (Kobe and Deisenhofer 1994).

Contrairement aux plantes, les motifs extracellulaires les plus observés chez les animaux et surtout chez l'humain sont le domaine Ig, *Ig-like* (immunoglobuline) et le domaine FN3 (fibronectine type III); il s'agit de domaines totalement absents chez les PRK. Le domaine LRR existe aussi chez les animaux et joue un rôle important au niveau du développement neuronal, thyroïdien et gonadique. À la différence des plantes, le domaine LRR chez les animaux se retrouve sur des récepteurs ayant perdu leur domaine kinase. Ces récepteurs possèdent soit un domaine JM, soit sont liés à la membrane par un lien glycosylphosphatidylinositol (GP1). La transduction des signaux via ces récepteurs se fait par l'entremise de recrutement de corécepteurs ayant des domaines kinases fonctionnels. (Fournier, GrandPre et al. 2001; Dunne and O'Neill 2003; Dievart and Clark 2004). Chez l'espèce *Homo sapiens*, le domaine LRR se retrouve au niveau du développement rétinale (*Nyctalopin*) et dans la réponse immunitaire (*Synleudin*) (Wang, Yang et al. 2003; O'Connor, Eisenhaber et al. 2005). La différence au niveau de la nature des domaines et du nombre de motifs extracellulaires, de la spécificité du domaine kinase et du type de récepteurs reflète une divergence évolutive entre le règne animal et végétal.

Cette divergence évolutive entre les deux règnes - au niveau des domaines extracellulaires des récepteurs - implique forcément une différence structurale importante au niveau des ligands reconnus par les PRK. Cette divergence évolutive pose une problématique au niveau de la caractérisation des ligands et de la détermination de leur structure, rôle et cinétique par des études d'homologie. Par exemple, la similarité entre les domaines extracellulaires des récepteurs CR4 (plante) et TNFR (animale) suggère que le ligand du récepteur CR4 ressemble au ligand du récepteur TNFR (Becraft, Stinard et al. 1996), mais ce dernier appartient à une famille de signaux ayant une faible similarité de séquence (Cosman 1994; Becraft 2002), ce qui ne permet aucune identification potentielle du ligand par similarité de séquence. De même, on peut croire que les ligands des récepteurs ayant des domaines de type EGF tels que les WAK (*wall associated kinase*) (He, Cheeseman et al. 1999) ou ceux contenant des domaines WAK peuvent avoir une similarité avec le ligand EGF animal. De ce fait, la séquence d'un récepteur peut donner des idées sur la nature – appartenance à une famille – ainsi que sur la séquence du ligand. En revanche, l'utilisation d'une stratégie basée sur la similarité des séquences – entre deux règnes – pour isoler de nouveaux ligands n'est pas recommandée à cause de la faible similarité de séquences tel que décrit dans le cas du récepteur CR4.

De plus, la divergence évolutive au niveau de la matrice extracellulaire (*ECM*) – différence structurale – entre les deux règnes complexifie la tâche d'identification de ligands orphelins par homologie de séquences. La MEC des plantes est de l'ordre de 100 nm d'épaisseur ce qui rend la diffusion à travers celle-ci difficile pour les molécules de l'ordre > 50 kDa (Carpita and Gibeaut 1993; Clark, Running et al. 1993), d'où la nécessité de petites molécules pouvant diffuser rapidement à travers les pectines, acteurs principaux du contrôle de la porosité de la MEC des plantes. À titre d'exemple, un domaine extracellulaire de 450 acides aminés en forme d'hélice- $\alpha$  aurait à peu près 68 nm de longueur (Stryer 1981), ce qui pousse à croire que les interactions directes entre des protéines adjacentes sont quasi impossibles, contrairement au modèle Delta-Notch chez les animaux. Ce modèle de MEC chez les végétaux a poussé les chercheurs à croire, pendant

longtemps, que les communications cellules-cellules chez les végétaux ne se faisaient qu'à l'aide de plasmodesmes, et ceci, jusqu'à la découverte du premier récepteur kinase chez le maïs en 1990 (Dievart and Clark 2004).

Toutefois, l'identification des ligands dans ce cas repose toujours sur des études génétiques et biochimiques (Becraft 2002). Parmi les quelques 620 récepteurs kinases de plantes identifiés suite au séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* (Shiu and Bleecker 2001; Shiu and Bleecker 2001), seul le mode d'action d'un petit nombre de couples ligand-récepteur a été élucidé jusqu'à ce jour.

Enfin, il faut noter l'importance des PRK chez les plantes. Ces derniers jouent un rôle très important au niveau physiologique et développemental allant de la croissance du tube pollinique (Wengier, Valsecchi et al. 2003) jusqu'à l'auto-incompatibilité sporophytique (Takasaki, Hatakeyama et al. 2000) en passant par la croissance de l'albumen (Becraft, Stinard et al. 1996), la différenciation du méristème (Clark, Running et al. 1993), la perception d'agent pathogène et l'activation des réponses de défense (Gomez-Gomez and Boller 2000) (voir le tableau 1 pour une vue plus complète).

Nom	Domaine	Ligand	Fonction (s)
<b>SRK</b>	S/PAN	SCR/SP11	Auto-incompatibilité sporophytique
<b>SLG</b>	S	SCR/SP11	
<b>BRI1</b>	LRR	BL	Division, différenciation et reproduction
<b>SERK1-5</b>	LRR	N/I	Embryogenèse somatique, stérilité male, signalisation des BRs, mort cellulaire et immunité
<b>Clavata 1-2</b>	LRR	CLV3	Maintien du méristème
<b>CORYNE</b>	LRR	CLV3	
<b>FLS</b>	LRR	Flg22	Défense plante – bactérie
<b>PRK</b>	LRR	N/I	Développement du gamétophyte
<b>ERECTA</b>	LRR	N/I	Régulation pléiotropique du développement
<b>WAK1</b>	EGF	GRP et Pectine	Expansion cellulaire. Senseur de tension
<b>LecRK1</b>	Lectine		Nodulation
<b>At3g26700</b>	LysM		Nodulation

**Tableau 1 :** Résumé des principaux récepteurs kinases chez les plantes.



## 1.1. Structure des récepteurs kinases

L'activation des RTK ou des PRK requiert deux processus fondamentaux : l'amplification de l'activité catalytique intrinsèque du récepteur et la création de sites d'ancrages pour les protéines de la cascade de signalisation (Hubbard and Till 2000). Ces deux processus sont accomplis par autophosphorylation du récepteur soit en *cis* (autophosphorylation) ou en *trans* (entre deux récepteurs identiques ou différents d'où la possibilité d'homo et d'hétérodimérisation). Dans le premier cas, l'induction de la dimérisation par le ligand induit un changement conformationnel ce qui facilite sa cis-autophosphorylation. Dans le second cas, la proximité des domaines intracellulaires induit une transphosphorylation. Cette phosphorylation du domaine intracellulaire induit l'activation du récepteur aboutissant ainsi à la transmission de l'information vers le noyau cellulaire. La structure des différentes composantes des récepteurs kinases sera élaborée dans ce chapitre de la façon suivante:

### 1.1.1 Le domaine extracellulaire

Les domaines extracellulaires des récepteurs kinases démontrent une grande variabilité au niveau de leur séquence ainsi qu'au niveau de leur structure tridimensionnelle, ce qui leur confère leur spécificité face à un large éventail de ligands. Dans le cas du récepteur SRK (*S-locus receptor kinase*), responsable de l'auto-incompatibilité chez plusieurs espèces de *Brassica*, des régions hypervariables (HV) déterminent la spécificité face au ligand SCR (*S-locus cystein rich protein*). Cette interaction est allèle-spécifique, d'où l'importance de ces régions dans le domaine extracellulaire (Glavin, Goring et al. 1994). Il existe chez les plantes environ une quinzaine de types de domaines extracellulaires (LysM, LRR, Lectine, WAK-like, S-domain, etc.); près de 50% des récepteurs ont un domaine LRR (Shiu and Bleecker 2001). Ce domaine est constitué par des répétitions riches en leucine ayant la séquence consensus suivante :

LxxLxxLxLxxNxLt/sgxIpxxLGx (Dievart and Clark 2003) et joue un rôle important dans les interactions protéine-protéine. Une autre caractéristique des domaines LRR rencontrés chez les plantes est la présence de paire de cystéines jouant un rôle dans la formation de ponts disulfures intra ou intermoléculaires comme dans le cas de *CLAVATA1/CLAVATA2* (Trotochaud, Hao et al. 1999).

Parmi les caractéristiques les plus importantes du domaine extracellulaire est l'existence de PLAD (*PreLigand Association Domain*). Ces dernières représentent des régions de contact physique afin de créer une homo/hétérodimerisation du récepteur. Les études sur le domaine extracellulaire du récepteur SRK ont démontré qu'un domaine PAN\_APPLE en position 347- 443 aa est responsable de la dimérisation ligand-indépendante du récepteur *in vivo*. Ce même domaine contient une région hypervariable (CVR) entre les acides aminés 410 et 420 qui aurait une implication importante dans la dimérisation homo ou hétérotypique du récepteur (Naithani, Chookajorn et al. 2007). De même, des régions riches en cystéines dans le domaine extracellulaire du récepteur animal TNF (*tumor necrosis factor receptor*) sont responsables de sa trimérisation *in vivo*, contrairement à ce qui a été postulé, c'est-à-dire que le ligand TNF- $\alpha$  (trimère) induirait l'oligomérisation du récepteur qui, par la suite, activerait une réponse cellulaire (Chan 2000; Chan, Chun et al. 2000).

De plus, le domaine extracellulaire joue un rôle important dans le maintien de l'auto-inhibition du récepteur inactif ainsi que dans la stabilisation du récepteur homo/hétéro/oligomérique (Schlessinger 2000; Schlessinger and Lemmon 2003). Les liaisons intramoléculaires entre les domaines II et IV (riche en cystéines) du récepteur EGF sont responsables de la création d'une contrainte physique responsable de la configuration auto-inhibée du récepteur (Schlessinger 2003; Schlessinger and Lemmon 2003). Bref, on peut dire que le domaine extracellulaire d'un récepteur est important pour la reconnaissance du ligand, la spécificité, le maintien de l'auto-inhibition et la stabilisation du récepteur.

### 1.1.2. Le domaine intracellulaire

Le domaine intracellulaire se divise en trois parties : le domaine juxta membranaire (JM), le domaine kinase et le domaine C-terminal. Ces trois parties jouent des rôles importants au niveau de l'activation du récepteur ainsi que de la transduction du signal.

Le domaine juxta membranaire est situé entre le domaine transmembranaire et le domaine kinase (Figure 1) et possède des résidus tyrosines dans le cas des RTK (Hubbard and Till 2000) ou des résidus sérine/thréonine dans le cas de certains PRK. Ces sites confèrent une importance cruciale au domaine JM puisqu'ils sont le lieu de plusieurs événements de phosphorylation ; environ 50 % des sites de phosphorylation du domaine intracellulaire sont situés dans le domaine JM (Nuhse, Stensballe et al. 2004). Lors de sa phosphorylation, le domaine JM agit comme site d'ancrage pour certaines phosphotyrosines ayant un rôle important dans le relais de la cascade de signalisation (Holland, Gale et al. 1997; Kuriyan and Cowburn 1997). Par exemple, le domaine JM du récepteur TrkA – récepteur du *Neural Growth Factor* (NGF) – contient un motif NPXY. Lors de l'activation de TrkA par autophosphorylation, le motif devient un site d'ancrage pour le domaine PTB de la protéine Shc (Obermeier, Halfter et al. 1993; Obermeier, Lammers et al. 1993; Loeb, Stephens et al. 1994; Holland, Gale et al. 1997), ce qui active la voie de signalisation Ras.

Par ailleurs, chez les plantes, le domaine JM a été démontré important lors de la construction de chimères ayant le domaine extracellulaire de BRI1 (perception) et le domaine intracellulaire de Xa21 (effecteur), un récepteur conférant une résistance à une souche de *Xanthomonas* chez le riz. Lors de la fusion BRI1 : Xa21, la chimère capable d'activer les mécanismes de défense en présence de brassinolides est celle ayant le domaine JM propre à l'effecteur, c'est-à-dire Xa21. Ainsi, si le domaine JM de BRI1 est utilisé au lieu de celui du récepteur Xa21 dans la construction de la chimère, aucune activation de la

défense n'est observable. Ceci indique que le domaine JM de Xa21 est important pour que la signalisation en aval de la perception puisse s'effectuer et que le domaine kinase seul n'est pas suffisant (He, Wang et al. 2000). Dans le cas de BRI1, le domaine juxta membranaire est phosphorylé (Oh, Ray et al. 2000). Des études de mutagenèse dirigée du domaine JM de BRI1 ont démontré que ce domaine n'est essentiel ni pour l'activité kinase de ce récepteur ni pour sa localisation au niveau de la membrane, contrairement à EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). Par contre, ce domaine est totalement requis puisque sa délétion donne un récepteur non fonctionnel. Il a été suggéré que son rôle serait de recruter des substrats de BRI1 et de stimuler l'augmentation de l'activité kinase de celui-ci (Wang, Li et al. 2005).

Il faut toutefois noter l'importance du domaine JM dans le contrôle de l'auto-inhibition des récepteurs. Par exemple, le domaine juxta membranaire offre un mécanisme de plus dans l'auto-inhibition du récepteur EphB2 animal. La région juxta membranaire de ce dernier perturbe le site actif du domaine kinase et l'inhibe, d'où l'importance de l'autophosphorylation des deux résidus tyrosine du JM du récepteur EphB2 pour l'activation de son domaine kinase (Wybenga-Groot, Baskin et al. 2001).

On peut donc conclure que le domaine JM est important pour l'auto-inhibition du récepteur, son activation et la signalisation par l'entremise d'une activité de recrutement des éléments en aval dans la voie de signalisation.

### 1.1.3. Le domaine kinase

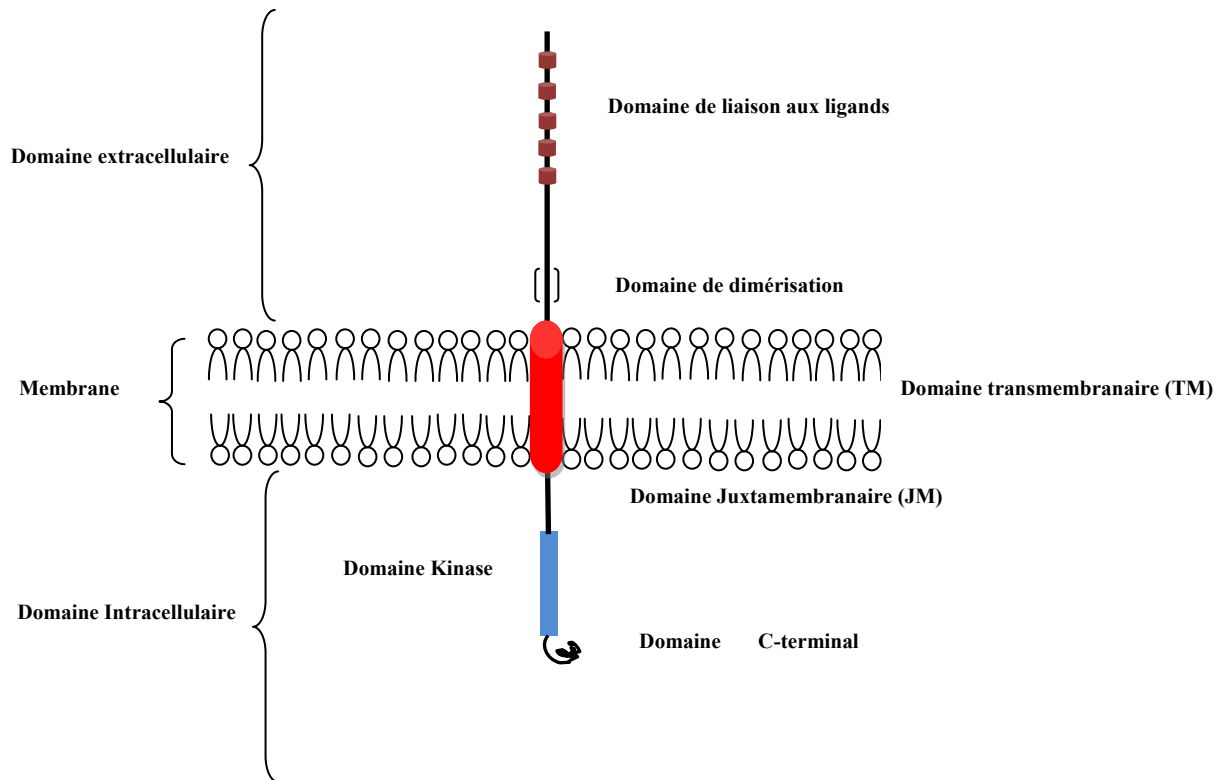
L'importance du domaine kinase réside dans sa fonction catalytique qui consiste en un transfert du  $\gamma$ -phosphate d'une molécule d'ATP vers le groupement hydroxyle des résidus tyrosine dans le cas des RTK ou des résidus sérine ou thréonine dans le cas des PRK. L'architecture globale du domaine consiste en un lobe amino-terminal constitué de 5 feuillets  $\beta$ , une hélice-  $\alpha$  et d'un grand lobe riche en hélices-  $\alpha$  en C-terminal (Taylor and Radzio-Andzelm 1994; Veron, Radzio-Andzelm et al. 1994). Le domaine kinase, bien qu'il ait une activité catalytique, peut aussi être le site de phosphorylation, quoique beaucoup moins abondant que les domaines JM et C-terminal (Oh, Ray et al. 2000), et sert aussi comme point d'ancrage pour certaines protéines de la voie de signalisation (Blume-Jensen and Hunter 2001).

Outre ces deux fonctions, le domaine kinase joue un rôle au niveau de la régulation de l'activité des RTK. Par exemple, dans sa configuration auto-inhibée, le résidu Tyr<sup>1162</sup> de la boucle d'activation du récepteur à l'insuline (IR) forme un lien hydrogène avec des résidus du site actif du domaine kinase prévenant ainsi la liaison de l'ATP dans celui-ci et par conséquent son activation (Hubbard 1999; Hubbard 1999). Cette forme de contrôle laisse croire que le domaine kinase joue un rôle important dans la régulation de l'activation des récepteurs tyrosine kinase.

On peut donc conclure que le domaine C-terminal revêt un rôle important au niveau de la transduction du signal et de la régulation de l'activité des récepteurs.

#### **1.1.4. Le domaine C-terminal**

La délétion du domaine C-terminal du récepteur BRI1 cause une activation du récepteur ainsi que la voie en aval indiquant que celui-ci joue un rôle de régulateur négatif de BRI1 (Wang et al. 2005 a). La présence de site de phosphorylation *in vivo* dans le domaine C-terminal (Nuhse, Stensballe et al. 2004) nous laisse croire à la modularité de ce dernier pour des fins inconnues jusqu'à ce jour. Bref, on peut conclure que le domaine C-terminal joue un rôle important dans la régulation du récepteur.



**Figure 1** : Structure d'un récepteur kinase archétype.

## 1.2. Mode d'action des PRK

Parmi les quelques 620 récepteurs kinases de plantes (Shiu and Bleecker 2001; Shiu and Bleecker 2001), seul le mode d'action d'un petit nombre de couples ligand-récepteur a été élucidé à ce jour. Parmi les mieux étudiés, BRI1, SRK, SERK, FLS et CLV1 sont impliqués respectivement dans la perception des brassinolides, la réponse d'incompatibilité sporophytique, la différenciation cellulaire, la défense bactérienne et le maintien du méristème.

Deux PRK seront décrits dans la présente section de par leur importance au niveau du projet et parce qu'ils sont les mieux caractérisés actuellement non seulement au niveau de la structure, mais aussi au niveau de la cascade de signalisation et de la réponse génique.

### 1.2.1. Le récepteur BRI1 et sa régulation

Un phénotype de nanisme a été responsable de la découverte et de la caractérisation du récepteur BRI1 (*brassinosteroide insensitive 1*) chez *Arabidopsis thaliana* suite à une mutagenèse à l'éthylméthanesulfonate (EMS) (Clouse 1996; Clouse, Langford et al. 1996). Ce phénotype est irréversible après l'ajout de brassinolides exogènes, ce qui suggère que la mutation touche un élément de la perception et non de la biosynthèse du brassinolide. Ce dernier est un polyhydroxystéroïde impliqué au niveau du développement chez les plantes (Li and Chory 1998).

BRI1 est un récepteur sérine/thréonine kinase ayant 24 domaines LRR dans sa partie extracellulaire (Vert, Nemhauser et al. 2005). L'interaction entre le récepteur et son ligand a été démontrée premièrement à l'aide de constructions chimériques BRI1:Xa21 où l'ajout du brassinolide induit une réponse Xa21 spécifique. Deuxièmement, une interaction directe entre le brassinolide radio marqué au  $^3\text{H}$  et son récepteur a permis de caractériser un



site de liaison de 70 acides aminés situés entre le domaine LRR21 et LRR22 (Kinoshita, Cano-Delgado et al. 2005). Cette dernière étude met fin au paradigme de liaison du brassinolide à son récepteur.

Un autre récepteur kinase ayant 5 domaines LRR nommé BAK1 (*BRI1 associated kinase 1*) a été découvert comme suppresseur d'un allèle faible de *bri1* lors de sa surexpression par *activation tagging* et comme interactant du domaine kinase de BRI1 dans un système double hybride (Nam and Li 2002). Par la suite, une expression conjointe des deux récepteurs dans un système microbien permet une auto-transphosphorylation mutuelle qui s'ajoute sur le fait que BRI1 existe en homodimère et que la formation d'un hétérodimère BRI1 : BAK1 se fait juste avant l'endocytose du complexe démontré par FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) (Rusina, Borst et al. 2004).

Ces données suggèrent que BRI1 existe sous forme homodimérique en l'absence de brassinolide et que la liaison de ce dernier induit une hétérodimerisation avec BAK1 agissant ainsi comme corécepteur ou comme cible en aval de BRI1 pour la transduction du signal et la régulation de l'activité signalisatrice de BRI1 par endocytose (Jin, Yan et al. 2007).

Il faut aussi noter que le mutant de délétion  $\Delta bak1$  ne présente aucun phénotype fort comparativement au mutant *bri1*, ce qui suggère qu'il n'est pas si important au fonctionnement de BRI1 ou qu'il agit de façon redondante avec les quatre membres de sa famille (Hecht, Vielle-Calzada et al. 2001). Par contre, la surexpression de BAK1 ne modifie en aucun cas la liaison des brassinolides sur leur récepteur BRI1 (Wang, Goshe et al. 2005), ce qui appuie l'hypothèse émise vis-à-vis de la fonction de BAK1.

Jusqu'à présent, quatre protéines ont été identifiées comme interactantes du domaine intracellulaire de BRI1 : *kinase associated protein phosphatase* (KAPP),

*transthyretine like* (TTL), *BRI1 Kinase inhibitor-1* (BKI1) et *TGF $\beta$ -receptor interacting protein 1* (TRIP1) (Nam and Li 2004; Wang and Chory 2006).

Tout récepteur kinase doit être régulé de façon optimale dans le but de maintenir l'intégrité de l'organisme surtout s'il est impliqué au niveau du développement. Une façon de réguler les récepteurs serait par une déphosphorylation spécifique due à l'action d'une phosphatase telle que KAPP. Cette dernière interagit avec plusieurs PRK dont CLV1, FLS2, WAK et plusieurs autres (Williams, Wilson et al. 1997; Gomez-Gomez, Bauer et al. 2001; Park, Cho et al. 2001). Les travaux sur KAPP ont démontré que celle-ci peut être activée par phosphorylation, ce qui provoque une déphosphorylation du récepteur dans le cas de CLV1 (Williams, Wilson et al. 1997). L'interaction physique de KAPP avec son récepteur s'avère faite spécifiquement au niveau des vésicules intracellulaires malgré sa localisation cytoplasmique comme le démontrent les études par FRET sur AtSERK (Shah, Russinova et al. 2002). L'interaction entre KAPP et BRI1 a été démontrée (Friedrichsen, Joazeiro et al. 2000) et est suspecté de jouer un rôle de régulateur négatif de l'activité de BRI1.

Un autre régulateur négatif du récepteur BRI1 est la protéine TTL puisque sa surexpression entraîne un phénotype similaire aux phénotypes des mutations faibles *BRI1* (Nam and Li 2004). Le rôle de TTL est toujours inconnu, mais le fait que sa localisation soit membranaire suggère qu'elle joue un rôle dans le recrutement des phosphatases ou dans l'endocytose de BRI1 (Vert, Nemhauser et al. 2005).

Tout comme TTL, la surexpression de BKI1 (*BRI1 Kinase Inhibitor 1*) entraîne le même phénotype que la surexpression de TTL. De ce fait, le rôle de BKI1 comme régulateur négatif de BRI1 a été suggéré. La protéine BKI1 a été découverte par double hybride et se distingue de TTL par le fait qu'elle soit spécifique à BRI1 et qu'elle ne puisse interagir avec aucun récepteur phylogénétiquement proche de BRI1. Sa localisation

membranaire et sa dissociation après ajout de brassinolides ont permis de stipuler qu'elle interagit avec BRI1 en l'absence de ligands pour empêcher ce dernier d'interagir avec BAK1 (Wang and Chory 2006).

TRIP1 interagit avec BRI1 *in vivo* (Ehsan, Ray et al. 2005) et montre un phénotype similaire aux mutants BRI1 lorsqu'on produit des plantes exprimant des constructions anti-sens TRIP1. Comme susmentionné, le fait que l'hétérodimère BRI1 : BAK1 se fait juste avant l'endocytose (Rusanova, Borst et al. 2004) suggère que BAK1 peut jouer un rôle dans la régulation de BRI1 par endocytose. Contrairement à l'idée où l'endocytose serait un moyen pour terminer la signalisation cellulaire comme dans le cas de Ste2p, récepteur de phéromone chez la levure (Hicke et al. 1998), l'endocytose dans le cas de BRI1 joue un rôle dans la transduction du signal. Ceci a été démontré par le fait que, suite à son internalisation dans les endosomes, le récepteur continue à signaler (Geldner, Hyman et al. 2007). Cependant, ce mécanisme est bien documenté chez les animaux surtout dans le cas de EGFR, TGF $\beta$ -R et des récepteurs couplés aux protéines G trimériques (DeFea, Zalevsky et al. 2000; Panopoulou, Gillooly et al. 2002; Shenoy, Drake et al. 2006).

Lors de l'activation du récepteur BRI1 par son ligand, une hétéro dimérisation survient avec BAK suite à une dissociation de BRI1 et de son inhibiteur BKI1, ceci menant à une déphosphorylation et à une dimérisation du complexe BES1/BZR1, deux facteurs de transcription qui activent le contrôle génique régi par les brassinolides. L'activation par déphosphorylation du complexe BES1/BZR1 est due à l'inactivation de la protéine GSK3/shaggy kinase BIN2 (Vert and Chory 2006) ainsi qu'à l'activation de la phosphatase BSU1 (Mora-Garcia, Vert et al. 2004). Dans quelques années, la caractérisation de toutes les composantes de la cascade de signalisation de BRI1 serait complétée et présenterait une vue complète des mécanismes de signalisation et de leur régulation chez les plantes (Figure 2).

**Figure 2 :** Model de la cascade de signalisation du récepteur BRI1.

### 1.2.3. Le récepteur SRK et sa régulation

Un des mécanismes les plus répandus pour contrecarrer l'effet de l'*inbreeding* sur le fitness génétique est l'auto-incompatibilité (AI) qui génère et assure le maintien de la diversité génétique au sein d'une même espèce. Ce système se traduit par une discrimination entre le soi et le non-soi. L'auto-incompatibilité sporophytique agit à plusieurs niveaux allant de l'hydratation du pollen jusqu'à la régulation génique, en passant par des mécanismes de reconnaissance moléculaire (Takayama and Isogai 2003). Contrairement au système immunitaire de l'espèce *Homo sapiens*, le soi est défini comme étant la condition qui induit une réponse, notamment en une inhibition du pollen (Nasrallah 2002).

Au niveau génétique, l'auto-incompatibilité est contrôlée par un seul locus multi-allélique ayant une transmission de type unitaire dans un contexte Mendélien, d'où la nomenclature S- haplotype (Nou et al, 1993). L'interaction entre un pollen et un pistil ayant le même S-haplotype conduit à l'activation de l'auto-incompatibilité qui se traduit par une inhibition du développement du tube pollinique.

Chez les *Brassicaceae*, la caractérisation du locus S a conduit à la découverte, au niveau des parois des cellules papillaires, d'une glycoprotéine soluble - ~55 à 65 KDa - nommée SLG (*S-Locus Glycoprotein*) et d'une protéine de type serine/thréonine kinase - ~94KDa - ayant toutes les caractéristiques d'un récepteur kinase. Cette protéine a été nommée SRK (*S-Locus receptor kinase*) (Stein and Nasrallah 1993). Outre le fait que ces deux protéines soient encodées par le locus S, la découverte de lignées de *Brassica* auto compatibles encodant soit des récepteurs SRK non fonctionnels (Goring et al, 1993, Nasrallah et al, 1994), soit des récepteurs ayant des faibles taux de SLG (Nasrallah and Nasrallah, 1989) a conduit à suspecter leur rôle dans l'auto-incompatibilité.

À l'échelle moléculaire, ces deux protéines partagent une très grande homologie de séquence au niveau de leurs parties extracellulaires (Stein, Howlett et al. 1991). De plus, les études comparatives démontrent qu'au sein d'un même haplotype la divergence au niveau du domaine extracellulaire de SRK et SLG n'est qu'à 10% (Goring and Rothstein 1992; Delorme, Giranton et al. 1995), contrairement à ce qu'on trouve comme différence entre divers haplotypes, d'où la classification de ceux-ci en deux classes. Mis à part l'homologie élevée, l'expression spatio-temporelle des deux protéines démontre un patron quasi identique au niveau des cellules papillaires du stigma (Stein, Dixit et al. 1996).

Puisque l'homologie et l'expression ne permettent pas de trancher entre ces deux protéines quant au rôle du déterminant femelle, des études de localisation ont été entreprises. Celles-ci ont démontré que, contrairement à SRK, SLG est une protéine soluble qui s'accumule dans la paroi des cellules papillaires (Kandasamy, Paolillo et al. 1989). Il faut toutefois noter que l'on retrouve une petite fraction de SLG dans les membranes, dépendamment des haplotypes et que SRK présente un patron inverse. Ceci est dû à un épissage alternatif faisant en sorte que l'un des produits de l'épissage est membranaire (Tantikanjana, Nasrallah et al. 1993).

Vu que les deux protéines ont des formes à la fois membranaires et secrétées, l'identification du déterminant femelle s'est avérée encore plus difficile. En considérant l'homologie, l'expression et la localisation, il a été stipulé que les deux molécules peuvent agir comme système de reconnaissance du même ligand. Et, afin de mieux comprendre le rôle exact de ces deux protéines dans l'auto-incompatibilité, plusieurs études de suppression et de phosphorylation ont été entreprises.

En vue de déterminer le rôle exact de chacune des protéines, la suppression de SLG à l'aide de constructions antisens a permis de restaurer la compatibilité. Cependant, il s'est avéré que SRK a été aussi supprimé à cause d'une cosuppression due à la grande similarité

de séquence (Shiba et al, 1995, 2000). Pour contourner le problème de cosuppression, Takasaki et al ont introduit le récepteur SRK<sub>9</sub> - haplotype de classe I - dans des lignées S<sub>60</sub>S<sub>60</sub> de *Brassica* de classe II. Ceci a permis de conférer la spécificité de l'haplotype S<sub>9</sub> à celles-ci et d'induire la réaction d'auto-incompatibilité contre le pollen S<sub>9</sub>S<sub>9</sub>. En revanche, les lignées transgéniques ayant la construction SLG<sub>9</sub> n'ont pas acquis la spécificité de l'haplotype S<sub>9</sub>S<sub>9</sub>.

De plus, la coexpression de SRK<sub>9</sub> et de SLG<sub>9</sub> dans ces mêmes lignées S<sub>60</sub>S<sub>60</sub> a abouti au rejet total du pollen S<sub>9</sub>S<sub>9</sub>. Ces résultats suggèrent que SRK représente le déterminant femelle. En outre, la découverte de lignées auto-compatibles de *Brassica oleracea* – S<sub>18</sub> et S<sub>60</sub> – n'exprimant pas SLG (Suzuki, Kusaba et al. 2000) met fin au paradigme du déterminant femelle. D'autres études de suppression de SLG démontrent une diminution considérable de l'accumulation de SRK au niveau membranaire malgré un taux de transcrit normal, ce qui pousse à croire que SLG joue un rôle accessoire dans l'AI (Takasaki, Hatakeyama et al. 2000). Un des rôles que SLG peut jouer est la stabilisation du récepteur SRK. Cette hypothèse est appuyée par les études de Dixit et al. ayant pu démontrer que la coexpression de SRK<sub>6</sub> et SLG<sub>6</sub> chez le tabac a prévenu la formation d'agrégats de SRK<sub>6</sub> (Dixit, Nasrallah et al. 2000).

Après la liaison du récepteur SRK avec son ligand SCR/SP11, s'établit une dimérisation du récepteur suivie d'une oligomérisation du complexe avec SLG/eSRK (*extracellular SRK*). La stabilisation du complexe provoque la transphosphorylation du récepteur, aboutissant ainsi à son activation et à la transduction du signal. Cette transduction se fait via la phosphorylation du domaine Z de la protéine ARC-1 (*arm repeat containing protein*), une protéine *Ubox* ayant une activité E3 Ubiquitine ligase et interagissant avec le domaine kinase de SRK via son domaine A (Stone, Anderson et al. 2003). La suppression de l'expression d'ARC-1 chez *Brassica napus* implique une diminution de l'intensité de l'AI (Stone, Arnoldo et al. 1999). Il a donc été proposé que

ARC-1 joue un rôle de médiateur positif dans la cascade de signalisation (Stone, Anderson et al. 2003). Suite à l'activation de ARC-1 par phosphorylation, cette dernière ubiquitine certains facteurs de compatibilité, tel que Exo70A1 (Samuel, Chong et al. 2009), et promeut leurs dégradations via le protéasome.

Deux autres protéines appartenant aux thioredoxine-h (THL-1/2) et ayant un rôle important au niveau de la cascade de signalisation ont été identifiées (Bower, Matias et al. 1996). Elles interagissent avec un résidu cystéine du domaine transmembranaire du récepteur SRK. Cette interaction s'avère primordiale dans la régulation de la signalisation via SRK (Mazzurco et al, 2001). Il a été démontré que THL1/2 préviennent l'autophosphorylation de SRK en l'absence de ligands suggérant ainsi leur rôle de régulateur négatif dans la signalisation (Cabrillac, Cock et al. 2001; Haffani, Gaude et al. 2004).

Un autre locus, M, indépendant et épistatique au locus S, a été identifié lors d'un croisement entre l'espèce incompatible *B rapa* ( $S_8S_8$ , MM) et le variant compatible *B rapa* *Yellow Sarson* C634 ( $S_{12}S_{12}$ , mm) (Hinata 1983). Le mutant ( $S_8S_8$ , mm), ayant perdu l'auto-incompatibilité au niveau du stigma mais non au niveau du pollen, suggère que l'un ou l'autre des produits du locus M jouent un rôle effecteur en aval de SRK (Hinata 1983). Le clonage positionnel du mutant *B rapa* ( $S_8S_8$ , Mm) par Murase et al. en 2004 a permis l'identification d'une protéine kinase de 404 acides aminés nommée MLPK (*M locus protein kinase*) ayant un motif de myristoylation, un domaine riche en serine et onze sous domaines kinases (Murase, Shiba et al. 2004). MLPK appartient à une famille de récepteurs n'ayant pas un domaine transmembranaire et est localisée au niveau de la membrane plasmique (Kakita, Murase et al. 2007). La mutation, *mlpk*, et l'interaction physique entre MLPK et SRK démontrée par BIFC (Kakita, Murase et al. 2007) suggère que MLPK joue un rôle d'activateur positif.



D'autres interactants ont été identifiés grâce à des études de double hybride, une calmoduline, une nexine (SNX1) et un homologue de la protéine KAPP d'*Arabidopsis* (Vanoosthuyse, Tichtinsky et al. 2003). Cette dernière, présente chez plusieurs PRK, notamment BRI1 (section BRI1), joue le rôle de régulateur négatif dans la cascade de signalisation de SRK.

La calmoduline interagit avec une  $\alpha$ -hélice du domaine kinase, précisément au niveau du sous domaine VIa. Par contre, les essais kinases ont démontré que la calmoduline n'est pas un substrat de SRK, ce qui écarte l'hypothèse du rôle qu'elle peut jouer comme composante de la cascade de signalisation de SRK. En outre, son rôle dans la signalisation chez les animaux est ambigu puisqu'il est contradictoire dans différents tissus animaux (San Jose, Benguria et al. 1992; Martin-Nieto and Villalobo 1998).

Un rôle possible a été suggéré pour la calmoduline : elle agirait comme médiatrice entre la signalisation  $\text{Ca}^{++}$  dépendante qui se fait au niveau de la pollinisation - hydratation du pollen - et la transmission du signal dans la réaction d'auto-incompatibilité.

L'interaction du récepteur, domaine kinase, avec la nexine, *bSNXI*, suggère un rôle au niveau de la régulation du signal par endocytose (Vanoosthuyse, Tichtinsky et al. 2003) puisque les nexines prennent part à la régulation de l'activité de certains récepteurs chez les animaux (Kurten, Cadena et al. 1996; Parks, Frank et al. 2001) et puisque *bSNXI* partage une très grande similarité de séquence avec *hSNX*.

Il a été démontré que SRK est régulé par endocytose suite à son activation par le ligand SCR (Ivanov and Gaude 2009). Il serait donc intéressant de construire un transgénique ayant une délétion dans SNX1 afin de prouver l'hypothèse concernant son rôle de régulateur de la signalisation. Bref, l'auto-incompatibilité s'avère un des mécanismes les plus complexes pour maintenir la diversité génétique au sein de certaines

espèces végétales. Les progrès futurs aideront à élucider un modèle complet pour l'AI (Figure 3).

**Figure 3 :** Modèle de la cascade de signalisation du récepteur SRK.

### 1.3. Mode d'action des récepteurs chez les animaux

Les récepteurs les mieux caractérisés sont ceux du règne animal et notamment ceux de la famille ERBB. Ces derniers sont des récepteurs tyrosines kinases jouant un rôle important dans le développement des cellules ainsi que dans des maladies graves comme le cancer. J'utiliserai donc cette famille, notamment ERBB1 ou EGFR, pour décrire la structure, l'activation, la fonction et la régulation d'un récepteur tyrosine kinase archétype.

#### 1.3.1. Le récepteur EGFR et sa régulation

Le récepteur EGFR (*epithelial growth factor receptor*) appartient à une famille de récepteurs composée de quatre membres ayant une activité tyrosine kinase : ERBB1 (EGFR), ERBB2 (HER2), ERBB3 (HER3) et ERBB4 (HER4).

Au niveau physiologique, EGFR se caractérise par un type de signalisation pléiotropique allant de la mitogenèse jusqu'à l'apoptose, de la différenciation jusqu'à la dédifférenciation et la migration (Wells 1999). Cette pléiotropie au niveau des réponses est due à la reconnaissance de différents ligands comme l'EGF, l'épireguline, l'amphireguline et la betacelluline (Wells, Gupta et al. 1998; Warren and Landgraf 2006). Cette capacité du récepteur à reconnaître différents ligands et à traduire différents signaux est due aux combinaisons d'hétérodimères possibles entre la famille ERBB ainsi qu'à l'évolvabilité et la modularité des réseaux de signalisation. Par exemple, ERBB1 interagit avec ERBB2 et 3 (inactifs, servent comme sites d'ancrage) mais non avec ERBB4. Ce dernier interagit avec ERBB2 seulement.

La partie extracellulaire du récepteur EGFR est constituée de quatre sous domaines : les domaines I et III (homologues) représentent les sites de liaison du ligand et les

domaines II et IV sont riches en cystéine et jouent un rôle dans l'auto-inhibition (Sawano et al. 2002, Hubbard S.R. 1999).

Le domaine intracellulaire présente 23 sites de phosphorylation dont 17 seraient dans le domaine C-terminal, 4 dans le domaine kinase et 2 dans le domaine JM (Thèse Germain). Le domaine JM, ~50 aa, sert de site de liaison de la PKC (protéine kinase C) et de la MAPK erk (*extracellular signal regulated kinase MAPK*). Il existe des évidences indiquant que le domaine JM joue aussi le rôle de site de liaison à des protéines G<sub>s</sub> trimériques (Sun, Chen et al. 1997). Le domaine C-terminal d'EGFR - 229 aa-est unique de par sa longueur comparativement aux autres RTK.

Lorsque le ligand se lie au domaine I et III du récepteur, il provoque un changement conformationnel conduisant à la dimérisation du récepteur. La plupart des récepteurs EGFR (non-liés) existent sous forme auto-inhibés et sont en équilibre avec 2% à 10% des récepteurs non liés mais constitutivement actifs (Ferguson, Berger et al. 2003). Par analogie, un traitement cellulaire aux inhibiteurs de PTPase (*phosphotyrosine phosphatase*) peut activer n'importe quel RTK cellulaire (Tonks and Neel 2001; Schlessinger 2003). Ces deux derniers points démontrent que l'auto-inhibition des RTK est de type *leaky* et que d'autres mécanismes de contrôle devraient entrer en fonction pour réguler l'activité des récepteurs. Parmi ces mécanismes, l'endocytose joue un rôle important dans la dégradation et le recyclage des récepteurs. Tous ces mécanismes régulent l'état stimulé/inhibé requis pour le contrôle du développement normal (Schlessinger 2000). Il serait intéressant de noter que la mutagenèse des sites de phosphorylation du domaine intracellulaire d'EGFR (liée) ne provoque aucune perte d'activité de phosphorylation des substrats de celui-ci. Ce dernier résultat confirme qu'EGFR (liée) est constitutivement actif malgré la perte des sites d'autophosphorylation. Ajoutons à cela qu'une proportion d'EGFR (non-liés) est constitutivement active (Honegger, Dull et al. 1988; Honegger, Dull et al. 1988).

Suite à son internalisation par endocytose, le récepteur EGFR peut continuer à signaler lorsqu'il se trouve dans les endosomes (Wang et al. 2002). Ce type de signalisation – dite endosomale – est nécessaire pour l'activation des voies MAP Kinases contrairement à l'activation de la voie régie par la phospholipase C qui nécessite le maintien du récepteur au niveau de la membrane plasmatique (Teis, Wunderlich et al. 2002).

## 1.4. Techniques d'identification des ligands orphelins

L'initiative des projets de séquençage de génomes complets (*Homo. sapiens*, *Mus. musculus*, *C. elegans*, *Arabidopsis thaliana*....) ainsi que le progrès survenu au niveau du développement des techniques moléculaires, de leur sensibilité (PCR, bio puces, séquençage....) et des systèmes d'information - notamment la bioinformatique et les bases de données - ont permis la découverte de nouveaux membres des familles protéiques. La majorité de ces membres sont dits orphelins car la technique de découverte ne permet pas de découvrir l'interactant protéique. Ceci a donc stimulé le développement de techniques complémentaires pour caractériser ce dernier qui peut être soit un récepteur soit un ligand. Dans cette section du mémoire, je tenterai d'exposer les avantages et les inconvénients de quelques techniques qui ont servi à identifier plusieurs partenaires protéiques dans la littérature.

### 1.4.1. Expression screening ou phage display

Au niveau de cette technique, la protéine orpheline est utilisée comme sonde pour le criblage d'une librairie d'expressions. La sonde peut être produite comme protéine recombinante fusionnée à un tag approprié tel que la phosphatase alcaline ou la région FC d'un anticorps. Une librairie d'expressions produite dans le phage lambda est transférée sur des membranes de nitrocelluloses et incubée avec la protéine orpheline (Young and Davis 1983). La détection d'une membrane positive permet l'identification de la séquence en acides aminés du ligand ou de l'interactant par le biais du séquençage du gène inséré à l'intérieur du phage (Figure 4).

Cette technique présente des limites importantes notamment au niveau du repliement des protéines ainsi qu'au niveau du changement conformationnel de la protéine native lors de la fixation sur les membranes de nitrocellulose. Une autre contrainte se pose si l'interactant au niveau génique est plus long que 1kb; le phage ne permet pas l'insertion de séquences géniques plus longues.

Par ailleurs, une technique alternative utilise des lignées cellulaires (telle que la lignée COS) permettant un meilleur repliement protéique comme librairie d'expression, ce qui conduit à contourner les problèmes susmentionnés (Aruffo and Seed 1987). Cette technique fait face à d'autres inconvénients comme la qualité des ADNc (longueur totale) et la nécessité d'interaction de haute affinité entre la protéine orpheline et l'interactant pour permettre la sélection des cellules positives.

**Figure 4 :** Schématisation de la technique du phage display.

### 1.4.2. Système à double ou à triple hybride

Ce système est basé sur un essai génétique chez la levure. Il repose sur le fait que si une interaction protéine-protéine a lieu, il y aura un rapprochement physique entre leurs domaines spécifiques. Le système double hybride consiste en : 1) la fusion d'une protéine orpheline avec un domaine A (domaine d'activation de la transcription), 2) la production d'une librairie ayant une fusion avec un domaine B (domaine de liaison à l'ADN). Lors de la transformation de la librairie chez la levure, l'interaction positive, si elle a lieu, permet un rapprochement des domaines A et B, ce qui se traduit par l'activation d'un gène rapporteur (Fields and Song 1989).

L'inconvénient majeur de ce système est qu'il présente beaucoup de faux positifs malgré une sensibilité très élevée. Celle-ci dépend des niveaux d'expression des constructions transformées (Hengen 1997).

### 1.4.3. Immunoprécipitation

C'est une technique qui repose sur la précipitation d'une protéine connue (*A* ou *A+tag*) grâce à un anticorps spécifique (*anti-A* ou *anti-A+tag*). Dans le cas où la protéine (*A*) interagit *in vivo* ou *in vitro* avec une autre protéine (*B*), le complexe (*AB*) peut être co-immunoprécipité et se traduit par une différence de mobilité sur gel (*mobility shift*). Par exemple, dans le contexte d'identification de ligands pour des récepteurs orphelins, le domaine extracellulaire du récepteur est fusionné à un tag, comme la phosphatase alcaline (*AP*) qui peut être reconnue et précipitée à l'aide d'anticorps commerciaux anti-AP. Par exemple, cette méthode a permis de caractériser des ligands solubles ou transmembranaires comme dans le cas de VEGFR et de c-Kit respectivement (Flanagan and Leder 1990; Chiang and Flanagan 1995).



Or, n'étant pas une méthode quantitative et ne démontrant pas de sensibilité assez élevée, cette technique présente plusieurs limites. De plus, dans certains cas, des protéines détectées par co-immunoprécipitation se sont avérées ne pas être les interactants directs, mais faisant partie d'un complexe protéique plus large (Catimel, Nerrie et al. 1997).

Une façon d'augmenter la sensibilité de cette technique serait par marquage chimique (*chemical crosslinking*) ou par photo-activation (*photoactivation crosslinking*) avant de procéder à l'immunoprécipitation. À titre d'exemple, la démonstration de la liaison directe entre le brassinolide et son récepteur (BRI1) a été effectuée par photo-activation (Kinoshita, Cano-Delgado et al. 2005).

Enfin, le marquage chimique présente à lui aussi quelques inconvénients : premièrement, le composé chimique peut modifier la structure protéique native en la dénaturant, ce qui rend l'immunoprécipitation impossible. Deuxièmement, le composé chimique crée des liens non spécifiques avec des protéines proches stériquement, ce qui augmente le risque de détections erronées. D'ailleurs, il existe une corrélation positive entre ce genre d'artefact et la taille du marqueur chimique (Phizicky and Fields 1995).

#### **1.4.4. Bioessai**

Le concept de bioessai consiste à mesurer et à standardiser la réponse cellulaire face à un stimulus et à en tirer profit pour une application technologique.

Dans le cas des bioessais de type *cell rescue*, une réponse bien définie - comme la survie et/ou la prolifération cellulaire - est utilisée pour détecter des ligands potentiels contre des récepteurs orphelins. Le domaine extracellulaire du récepteur orphelin est fusionné avec le domaine intracellulaire incluant le domaine juxta membranaire du

récepteur responsable de la réponse survie et/ou prolifération. Une réponse positive indique une activation de la chimère et donc une liaison du ligand recherché.

Cette méthode a été utilisée pour la découverte de ligands au RTK dans un système utilisant une chimère RTK : récepteur à l'érythropoïétine (Collins, M.K.L et al, 1988. Pacifici, R.E et Thomason A,R. 1994). Les bioessais présentent des inconvénients au niveau de la sélectivité puisque les cellules possèdent plusieurs récepteurs à leur surface et répondent contre un éventail de stimulus (Nice, Catimel et al. 1997). De plus, la mise au point des bioessais est très laborieuse. Ces inconvénients peuvent être dépassés par une automatisation des bioessais et par l'utilisation de chimères et des types cellulaires n'exprimant pas le récepteur d'intérêt, ce qui augmente la sélectivité du bioessai.

#### **1.4.5. Biosenseur**

Le concept de biosenseur consiste en : 1) une sonde biologique ayant une reconnaissance spécifique contre un composé (chimique, protéique...) et interagissant avec ce dernier. 2) un transducteur qui traduit le signal en signal électronique qu'on peut amplifier et analyser.

Plusieurs biosenseurs sont actuellement sur le marché et utilisent des technologies différentes. Parmi celles-ci on retrouve : *les Cytosensors ou microphysiometre*, *les single cell biosensors*, *Iasys* et *les BIAcore* (McConnell, Owicki et al. 1992; Malmqvist 1993; Malmqvist 1993; Shear, Fishman et al. 1995). Seuls le *Cytosensor* et le *BIAcore* seront élaborés de façon succincte dans cette section.

#### 1.4.5.1. Cytosensor

Cet instrument utilise un *Light Adressable Potentiometric Sensor* (LAPS) pour mesurer un changement au niveau du pH extracellulaire suite à une stimulation. Ce système a été développé sur un principe qui repose sur le fait que n'importe quel stimulus est accompagné d'une acidification de l'environnement cellulaire due à la glycolyse, à la respiration et à l'hydrolyse de l'ATP (McConnell, Owicki et al. 1992). Cette acidification est due à la libération d'ions  $H^+$  tel que décrite par la réaction d'hydrolyse de l'ATP ( $ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i + H^+$ ) ou par la réaction de glycolyse ( $C_6H_{12}O_6$  (glucose) + 2 ADP + 2  $P_i$  + 2  $H^+$  + 2  $NAD^+$   $\rightarrow$  2  $CH_3-CO-COO^-$  (pyruvate) + 2 ATP + 2 (NADH,  $H^+$ ) + 2  $H_2O$ ). La sensibilité du système est très élevée allant jusqu'à la détection d'un changement de l'ordre de 0.001 unité pH. Par exemple, la sensibilité du système est démontrée lors de la détection de changement physiologique avec des concentrations de 0.1ng/ml du facteur NGF (*neural growth factor*) lors d'un traitement des cellules PC12 (Pitchford, De Moor et al. 1995).

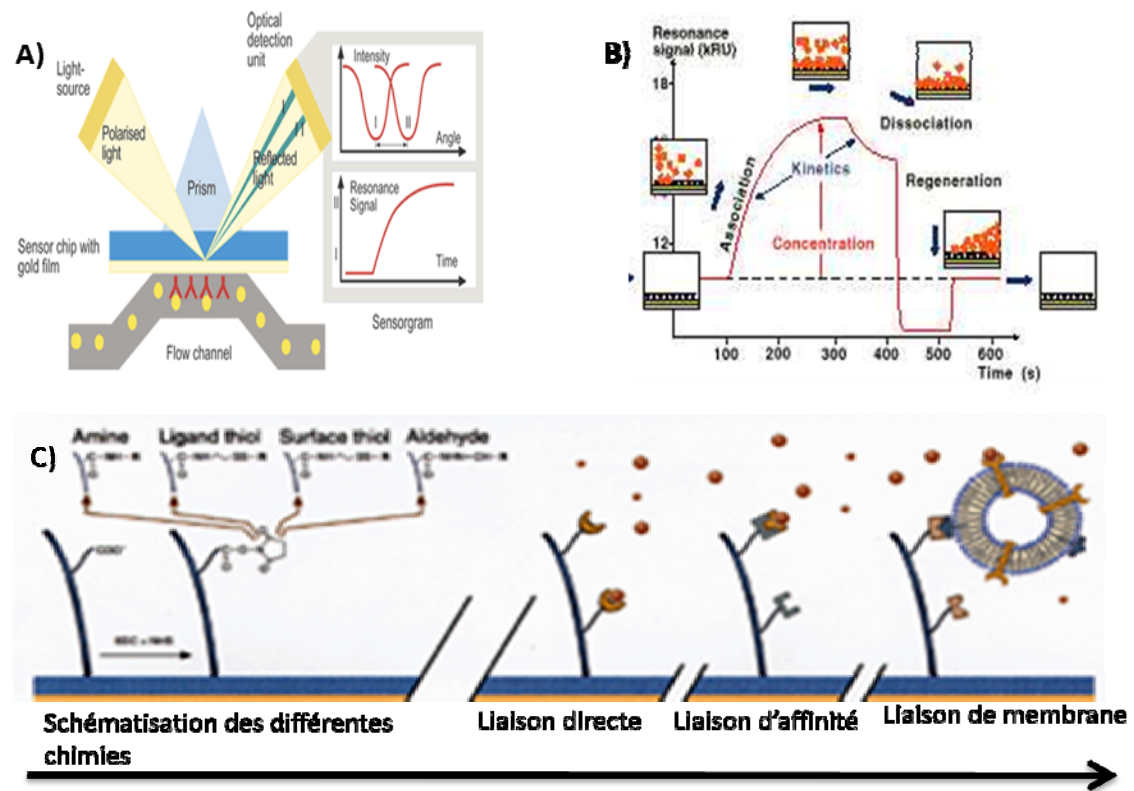
#### 1.4.5.2. BIAcore

Le BIAcore est un biosenseur qui utilise le principe de la résonance des plasmons de surface (Nice and Catimel 1999). Il consiste en l'immobilisation d'un partenaire de l'interaction recherchée - un récepteur par exemple - sur une matrice chimique à base de dextran (carboxymethyldextran) (Figure 5, C). Celle-ci est attachée de façon inerte par des liaisons alkanethiol sur une surface d'or. Un rayon lumineux<sup>1</sup> incident bombarde la surface en or et interagit avec les électrons libres (en oscillation, nommés plasmons) de l'or à un

---

<sup>1</sup> La lumière est une dualité onde-corpuscule, elle présente à la fois les caractéristiques d'une onde électromagnétique et d'une particule ; le photon. C'est ce dernier qui interagit avec les électrons de l'or.

angle donné ( $A_c$ ), il y a résonance entre le photon et les plasmons, ce qui provoque un transfert d'énergie vers les électrons de la surface métallique résultant en une diminution de l'intensité ou *minima* de la lumière réfléchi. Cet angle,  $A_c$ , dépend de l'indice de réfraction du milieu opposé<sup>2</sup> à l'incidence de la lumière (Figure 5, A). La mesure des changements dans l'indice de réfraction permet à l'instrument de calculer le changement dans la masse lors de la liaison ou la dissociation du ligand (Figure 5, B).



**Figure 5 :** Illustration du principe de la SPR (*surface plasmon resonance*). A) Schéma du principe de la SPR. B) Cinétique de liaison d'un ligand à son récepteur. C) Représentation de la matrice, du couplage et des différents types de liaison. Image adaptée du site web [www.rci.rutgers.edu](http://www.rci.rutgers.edu)

<sup>2</sup> Partie opposée équivalente à la partie en contact avec la protéine fixée sur la matrice et où le flux du tampon ayant les protéines d'intérêt passe en contact avec cette matrice.

## 1.5. Présentation du projet de recherche

Le projet entrepris dans notre laboratoire de recherche vise à développer un bioessai pour la découverte de nouveaux ligands peptidiques chez les plantes. Ce projet a été élaboré suite au projet de séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* et de la découverte de ~600 récepteurs de type sérine/thréonine kinase. La majorité de ces récepteurs sont dits orphelins puisqu'aucun ligand ne leur a été attribué. Le bioessai comporte une stratégie à haut débit qui essaye d'éliminer les difficultés énoncées dans l'introduction du mémoire et qui vont être énumérées sous forme de points dans cette section :

1. La divergence évolutive des domaines extracellulaires entre les RTK et PRK rend la caractérisation des ligands par homologie difficile.
2. La différence au niveau de la matrice extracellulaire entre les règnes animal et végétal exerce une pression évolutive sur la taille ainsi que sur la séquence des ligands, ce qui complexifie l'identification par homologie.
3. L'identification par des techniques biochimiques ou génétiques reste une tâche laborieuse.

Le projet de maîtrise vise à tester deux stratégies différentes pour la mise au point d'un bioessai (Figure 6). La première consiste à fusionner la PRK à l'étude avec le domaine intracellulaire du récepteur tyrosine kinase animal (EGFR) et, suite à l'interaction avec une fraction protéique contenant un ligand correspondant à la PRK étudiée, une transphosphorylation de l'endodomaine serait détectable. La seconde stratégie utilise l'endodomaine du récepteur BRI1, un récepteur répondant aux brassinostéroïdes, suite à l'interaction avec une fraction protéique contenant un ligand correspondant à la PRK étudiée. Ceci nous permettrait de mesurer l'activation d'un gène rapporteur répondant normalement à une activation par les brassinostéroïdes.

**Figure 6 :** Schématisation des deux stratégies utilisées pour le développement du bioessai.

## **2. Matériel et Méthodes**

### **2.1. Construction des plasmides**

#### **2.1.1. Clonage de BRI1 dans pBlue Script II (+)**

Une PCR sur l'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana* a été performée suivant le protocole ci-dessous : de l'amorce Nes-BRI1-5UTR-F TTCTCTCTCTCCTCTCTTTCT, 1 µl de l'amorce Nes-BRI1-3UTR-R CCAAATTAATTCCGACAATAAT, 1 µl dNTP, 5 µl tampon HF, 0.5 µl Phusion polymerase (phusion polymerase, Finnzyme, cat# F-530-L), 2 µl DMSO et 39.5 µl H<sub>2</sub>O. Le produit de PCR a été purifié sur gel à l'aide du kit Qiagen gel extraction kit (Qiagen, cat # 28704) et cloné à l'aide de la T4 ligase dans pBlueScript II prédigéré avec l'enzyme EcoRV.

#### **2.1.2. Séquençage de BRI1**

Le séquençage de BRI1 a été effectué à l'institut de recherche en immunologie et en cancérologie (IRIC) de l'Université de Montréal en utilisant les amorces internes du plasmide pBlueScript II T3 et T7. Les amorces ont été fournies par le service de séquençage à des concentrations de 5 µM.

## **2.2. Clonage des promoteurs BL induits et des chimères**

### **2.2.1. La réaction BP**

Les produits de PCR (promoteurs, endoSRK<sub>6</sub> et endoBRI1) ayant été amplifiés avec les amorces contenant les sites attB ont été clonés dans le vecteur pZeo (Invitrogen) à l'aide de la BP clonase (Invitrogen, Cat. No. 11789-013). La réaction a été effectuée dans un volume final de 20 µl (2 µl-4 µl du produit de PCR-attB (50-300ng), 1 µl du vecteur intermédiaire ou donneur (150ng/ µl), 4 µl du tampon BP 5X, complété à 16 µl avec du TE pH8.0). Par la suite, la réaction est incubée pendant une heure à 25 °C et suivie de l'inactivation de l'enzyme à 37 °C pendant 15 minutes après ajout de 2 µl de protéinase K. Le produit de la réaction (1 µl) est transformé dans les bactéries TOP10 en suivant la procédure décrite à la section 2.4 Matériel et méthodes.

### **2.2.2. La réaction LR**

La réaction de clonage des constructions promoteur : pZeo, BRI1 : pZeo et EGFR : pZeo dans les vecteurs finaux pMDC162, pMDC32 et pMDC83 respectivement a été effectuée en utilisant la LR clonase II (Invitrogen, Cat. No 11791-020). Elle a été réalisée dans un volume final de 10µl (1 µl vecteur (50-150ng), 1 µl vecteur final (150 ng/µl), 2 µl LR clonase II et 6 µl TE pH8.0). Par la suite, elle a été incubée pendant 24h et a été suivie d'une inactivation de l'enzyme en ajoutant 1 µl de protéinase K à 37 °C pendant au moins 15 minutes.



### **2.2.3. Sélection et séquençage**

La sélection des transformants est effectuée grâce à la sélection des bactéries résistantes à l'antibiotique correspondant à la construction. Suite à la sélection, une cartographie de restriction est performée afin de sélectionner les colonies positives. Puis, les clones positifs sont envoyés au séquençage à l'IRIC. Les amorces spécifiques ont servi à la fois à l'amplification des promoteurs (20  $\mu$ M), à l'amplification des différentes parties des chimères (20  $\mu$ M) et au séquençage (5  $\mu$ M) de ceux-ci.

## **2.3. Mini préparation d'ADN**

Les mini-préparations d'ADN plasmidiques effectuées durant toute la période de ce travail ont été faites suivant une des deux méthodes décrites ci-dessous dépendamment du degré de pureté requis.

Pour une pureté élevée, nous avons utilisé le kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) selon le protocole du fabricant. Sinon, les autres minipreps ont été effectuées selon le protocole décrit par Sambrook (Sambrook et Maniatis, 1989, p 125).

Des modifications ont été apportées à ce dernier : Les cultures bactériennes sont effectuées dans un volume de 5 ml au lieu de 2 ml. Un deuxième lavage au chloroforme isoamyl a été opéré lors de la purification au phénol chloroforme.

### 2.3.1. Extraction au phénol chloroforme

Mesurer le volume de la solution à purifier, ajouter un volume identique à celle-ci de phénol isoamyl (24 :1) froid, ensuite centrifuger à 14000 rpm pendant 5 min à 4 °C. Transférer le surnageant dans un nouveau tube contenant un volume égal de chloroforme, bien mélanger au vortex. Centrifuger à 14 000 rpm pendant 5 min à 4 °C.

Transférer le surnageant dans un nouveau tube et ajouter 1/10 volume de NaOAc (pH 5.2, 3M) et 2,5 volumes d'éthanol 95 %. Incuber le mélange à - 80 °C pendant au moins 30 minutes puis centrifugé pendant 30 minutes à 14000 rpm à 4 °C.

Laver le culot 2 fois à l'éthanol 70 %, sécher et suspendre de nouveau dans (5-300µl) de TE (pH 8.0) selon le besoin.

## 2.4. Transformation des souches bactériennes *E coli* (Top10) et *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1)

La souche *E.coli* (Top10) de chez Invitrogen a été transformée par une méthode de chemotransformation au choc thermique. Elle a été rendue chemocompétante suite à un traitement au  $\text{CaCl}_2$ .

La transformation de 200µl de bactéries compétentes avec 5 µl d'ADN plasmidique (50-100 ng/µl) a été effectuée dans un bain-marie à 42 °C pendant 90 secondes et a ensuite été transférée sur glace pendant deux minutes. Par la suite, les bactéries ont été incubées à 37 °C durant au moins 45 minutes en présence de 800 µl de milieu de culture LB stérile (NaCl 1%, Tryptone 1%, Extrait de levure 0,5 %). Suite à l'incubation, les cellules ont été étalées sur un milieu LB agar qui dispose d'un antibiotique spécifique permettant ainsi une sélection des colonies positives ayant incorporé le gène de résistance plasmide spécifique (cf. annexe II).

La souche *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 a été transformée par électroporation. Pour chaque réaction de transformation, 25 µl de la souche C58C1 ont été mises en solution avec 0.5 µl d'ADN plasmique. Par la suite, la solution est placée dans une cellule d'électrotransformation stérile. Cette dernière est installée dans un électroporateur, où elle a été exposée à un potentiel électrique de 2667 V (400V\*cm dans une cellule de 1.5mm). Finalement, le produit de la réaction est récupéré à l'aide d'une pipette et mélangé de LB à 30 °C (NaCl 1%, Tryptone 1%, Extrait de levure 0,5 %) pendant une heure. 50 µl et 100 µl de la solution sont étalé sur du milieu LB agar contenant l'agent de sélection (Tableau II Annexe).

## **2.5. Génotypage des plantes *Brassica* S<sub>6</sub>S<sub>6</sub> et S<sub>13</sub>S<sub>13</sub>**

### **2.5.1. Méthode de Southern**

#### **2.5.1.1. Récolte des tissus**

Les tissus, feuilles, à peu près de 500 mg de *Brassica olearacea* ont été récoltés sur les haplotypes S<sub>6</sub>S<sub>6</sub> et S<sub>13</sub>S<sub>13</sub> qui ont été fournis par Dr June Nasrallah. Les tissus ont été conservés sur glace sèche dès la récolte afin de pouvoir effectuer l'extraction de l'ADN génomique.

#### **2.5.1.2. Extraction de l'ADN génomique**

L'extraction de l'ADN génomique a été effectuée selon le protocole de Murray et Thompson, 1980 décrit dans le livre *Arabidopsis : a laboratory manual* aux pages 177-178 avec les modifications suivantes : 9 ml de la solution de d'extraction de l'ADN génomique : 100 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM EDTA, 0.7 M NaCl, 1% (w/v) CTAB

(*cetyltrimethyl ammonium bromide*), 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, préchauffé à 65 °C dans un bain-marie ont été ajoutés à 500 mg de poudre de feuilles préalablement broyées à l'azote liquide. La solution a été incubée à 60 °C pendant 90 minutes, suivie d'une incubation de 5 min à température pièce. Par la suite, la solution est mélangée par inversion avec 4.5 ml de chloro isoamyl (24 :1) pendant 5 minutes. Ensuite, la solution est centrifugée à 5500 rpm pendant 10 min à 25 °C. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube contenant 1/10 volume de CTAB (10%) dans 0.7M NaCl. À ce niveau, il faut répéter la phase chloro isoamyl.

Après la deuxième centrifugation, le surnageant est transféré dans un tube contenant le tampon de précipitation (50mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA, 1% CTAB). Le tout est incubé pendant 30 minutes à température ambiante et est suivi d'une centrifugation à 10000 rpm pendant 5 minutes. Le culot ainsi obtenu est suspendu de nouveau dans 300  $\mu$ l du tampon TE (1X) à pH 8.0 contenant 4  $\mu$ l d'ARNase A (10mg/ml). La solution est incubée à 37 °C pendant 20 minutes. Afin d'éliminer les protéines ainsi que l'ARNase A, nous avons procédé à une étape de purification au phénol chloroforme suivant le protocole décrit au point 2.2 de ce mémoire.

## **2.5.2. Migration et Hybridation sur membrane**

### **2.5.2.1. Préparation des sondes**

Les sondes ont été fabriquées à l'aide du kit Ambion™ ou Roche™ selon les protocoles correspondants des manufacturiers. L'  $\alpha$ -32 ATP comme nucléotide radio marqué au lieu du CTP a été utilisé lors de la fabrication des sondes. Ces dernières ont été purifiées grâce à une colonne maison ayant du Sephadex G-50™ et l'activité a été mesurée dans un compteur à scintillation. Les valeurs plus grandes que 50000CPM A ont été retenues pour l'hybridation.

### 2.5.2.2. Traitement de préhybridation, hybridation et post hybridation

Les membranes ont été pré-hybridées et hybridées avec une solution de formamide 50%. La température de préhybridation et d'hybridation est de 45 °C pour le tampon formamide. La préhybridation a été effectuée pendant 24 h tandis que l'hybridation a été effectuée pendant 18 h.

### 2.5.2.3. Exposition de la membrane

Selon l'intensité de la radioactivité mesurée avec un compteur Geiger directement sur la membrane, celle-ci a été exposée sur un film pendant une durée allant de 5 minutes à 24h dans une cassette à -80 °C. La révélation du film a été effectué grâce au système *typhoon phosphoimaging*<sup>TM</sup> d'Amersham bioscience.

## 2.6. Production des protéines SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub>

Les plasmides pBADgIII ayant les constructions SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub> nous ont été fournis par Dr. June Nasrallah de l'Université Cornell. Les constructions ont été 6Xhis étiquetées en C-terminal. Les plasmides ont été chimiotransformés dans des souches *E.coli* TOP10 puis mis sur pétris ayant l'antibiotique approprié. Les colonies bactériennes ont été inoculées dans 5 ml de LB + antibiotique approprié et incubées avec une agitation continue O/N à 37 °C jusqu'à une DO de 1.

Dans un premier temps, l'expression des deux protéines est testé en faisant une expérience pilote afin de déterminer la concentration optimale d'arabinose requise pour une

meilleure expression des protéines recombinantes. Pour ce faire, cinq tubes de 5 ml [LB + Amp (50µg/ml)] ont été inoculé avec 0.1ml de la culture O/N suivie d'une incubation à 37°C avec agitation jusqu'à une DO de ~ 0.5 (phase ½ Log). L'étape suivante a consisté en un prélèvement du contrôle non induit de 1ml (centrifugation 13000 rpm pendant 1 min) et l'ajout de 0.1 ml d'arabinose (Tableau2), suivi d'une incubation à 37 °C avec agitation pendant 4 h.

Tube #	Volume (ml)	Solution stock	Concentration finale
1	0.1	0.002 %	0.00002 %
2	0.1	0.020 %	0.00020 %
3	0.1	0.200 %	0.00200 %
4	0.1	2.000 %	0.02000%
5	0.1	20.00 %	0.20000 %

**Tableau 2 :** Tableau récapitulatif des différentes concentrations d'arabinose utilisées lors de l'expression pilote des protéines SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub>. La concentration d'induction optimale a été retenue pour l'expression de ces protéines recombinantes.

Après quatre heures, un millilitre de la culture a été prélevé et centrifugé à 13000 rpm pendant 1 minute et suivi d'une élimination du surnageant. Le culot a été resuspendu dans 100µl de SDS *sample buffer* 1X et 5µl ont été migrés sur un gel SDS-PAGE 15%, pendant 2 heures. Un échantillon de 5µl a été migré sur un gel SDS-PAGE 15%, pendant 2 heures (100V).

Dans un deuxième temps et suite à l'induction des bactéries avec la concentration optimale d'arabinose, un choc osmotique a été effectué afin de vérifier la solubilité des protéines induites. Les bactéries ont été centrifugées à 5000rpm pendant 5 minutes. Par la

suite, le culot a été resuspendu dans un volume X (dépendamment de la DO de la culture, voire le protocole pBADgIII du manufacturier) de la solution A (20 mM Tris-HCl, 2.5 mM EDTA, 20% sucrose) et suivi d'une incubation de 20 min. Puis, l'échantillon a été centrifugé une deuxième fois à 5000rpm, le surnageant récolté et le culot resuspendu dans la solution B (20 mM Tris-HCl, 2.5 mM EDTA) pendant 40 minutes. Une troisième centrifugation a permis de récolter le surnageant et le culot. Les échantillons ainsi moissonnés ont été migrés sur un gel SDS-PAGE de 15 % pendant 1 heure à raison de 5 µl par puits.

## **2.7. Purification des protéines SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub>**

### **2.7.1. Migration sur gel SDS-PAGE et Transfert sur membrane**

Une fraction des protéines SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub>, obtenue suite à la purification Ni-sepharose, ont été déposée sur un gel SDS-PAGE de 15% et migrée pendant 4 heures à 100V. Suite à la migration, le gel a subi un transfert sur membrane de PVDF dans du tampon de transfert (25mM Tris, 192mM Glycine, 20% v/v MeOH et 5% SDS 0.1%). Le transfert a été effectué à 4 °C pendant 1h (100 V).

### **2.7.2. Western Blot**

Afin de pouvoir faire des analyses de type Western blot, la membrane est séchée puis déposée dans un pétri contenant 10 ml de solution de blocage pendant deux heures (10ml TBS, 0.05% Tween 20 et 0.5% lait écrémé en poudre). Suite au blocage, trois étapes de lavage dans du tampon 1 (30ml TBS et 0.05% Tween 20) sont nécessaire afin d'enlever l'excès de protéines de lait.

La membrane est incubée pour au moins une heure avec l'anticorps primaire Anti-His (1 :20 000) dans 6 ml de solution contenant (6ml TBS, 0.25% Triton X-100 et 2% de lait). Cette étape est suivie de trois étapes de rinçages de 15 minutes chacune dans 30 ml d'une solution contenant du TBS et 0.05% de Tween 20. L'incubation avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (1 : 10 000) a été effectuée dans 6 ml (TBS, 0.25% Triton X-100 et 2% de lait) pendant une heure. Par la suite, trois lavages de 15 min sont nécessaires (30ml TBS et 0.05% Tween 20) avant de procéder à l'étape de révélation.

La révélation se fait en ajoutant 1 ml de la solution A et 25 µl de la solution B (Amersham bioscience) sur la membrane. Cette dernière est laissée incubée pour deux minutes puis est scellée et exposée.

## **2.8. Biotest d'activité des protéines SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub>**

### **2.8.1. Biotest**

Le biotest d'activité des protéines SCR a été effectué en déposant 5 µl du produit de purification sur le stigma des fleurs (stade -3) pendant 6 heures. Ensuite, du pollen viable (stade 0) a été déposé à l'aide d'un pinceau sur le stigma. Les fleurs sont laissées 24 heures puis coupées, fixées et colorées au bleu d'aniline.

### **2.8.2. Fixation des fleurs**

Les fleurs pollinisées ont été fixées avec la solution de Carnoy (éthanol : acide acétique) proportion 3 :1



### **2.8.3. Coloration au bleu d'aniline**

Avant de procéder à la coloration, deux lavages des fleurs à l'eau stérile ont été effectués dans un tube Falcon™ de 50 ml. Les échantillons ont été traités dans une solution de 8N NaOH à 60 °C pendant 1 heure et suivis de six lavages à l'eau. Les fleurs ont été par la suite disséquées afin de libérer le pistil. Le tissu végétal ainsi obtenu – stigma – a été mis sur lame. Avant de visualiser sous microscope, deux gouttes de bleu d'aniline (0.1%) dans 0.1% K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ont été déposées sur le stigma puis écrasées avec une lamelle.

## **2.9. qPCR des gènes BL induits**

### **2.9.1. Design de l'essai**

Le design des essais PCR a été effectué en utilisant l'algorithme de la compagnie Roche ([https:// www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp](https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp)) spécifiquement conçu pour la technologie TaqMan® et utilisant la librairie universelle de sondes (UPL) de Roche.

Lors du design des essais, des règles ont été suivies afin d'augmenter la stringence. Ces règles devraient être suivies en tout temps. Lors de la conception de l'essai, il est primordial de surveiller les aspects suivants : s'assurer que la taille de l'amplicon est entre 60 et 150 pb, qu'une des amorces ou la sonde se situe sur la jonction exon- exon, que l'intron doit être d'une taille supérieure à 500 pb pour éviter son amplification et de vérifier la spécificité des amorces par BLAST.

Les séquences des amorces, les annotations des gènes induits par le brassinolide (BL), des gènes *housekeeping* ainsi que les sondes (numéros) sont exposées dans le tableau suivant :

Gènes	Amorce A	Amorce B	Sonde
<b>At5g57560</b>	GCTCAACAAAGGATGAGATGG	CCTCTTCGCATCCGTACAAT	6
<b>At2g21200</b>	AGCCGAAGAAGAGTTCGGGTTTGA	ATAGCTGAGAAGCTGCAGCGACAA	SYBR
<b>At2g36220</b>	ACACGTCGACGAGAAACACA	CCGTCGAATACCGACTTCTC	4
<b>At1g69490</b>	GAACCAGACCATGTCTAAACCA	TTTCTCCAAACTCTGTTTTCTCG	94
<b>At4g25810</b>	ATCACTTAGCAATGGCGATGA	AAGAAGCAAGCAGAGCAACC	22
<b>Actine 2</b>	CCGCTCTTTCTTTCCAAGC	CCGGTACCATTGTCACACAC	30
<b>Tubuline 5</b>	GAAGTGCATTGCCTTCAA	TGTTCCCATTCTTGAACCTG	52

**Tableau 3 :** Séquences des amorces, noms des gènes et numéros des sondes UPL utilisées dans l'essai qPCR.

### 2.9.2. Extraction de l'ARN

150 plantules de 10 jours ont été incubées pendant (0, 0.25, 0.5, 1 et 3H) avec du brassinolide (10 $\mu$ M et 100 $\mu$ M) dans 50 ml de milieu de culture ½ MS liquide et utilisées pour l'extraction de l'ARN total. Les ARN totaux ont été extraits de chaque lot par la méthode du Trizol. Les tissus ont été broyés à l'azote liquide dans un mortier et un pilon stérile préalablement refroidis. La poudre a été transférée dans un tube 2ml stérile préalablement refroidi à l'azote liquide. L'ajout de 1ml de Trizol pour environ 200mg de tissu sec a été effectué. Le mélange a été vortexé jusqu'à resuspension complète de la poudre puis incubé pendant 5 minutes à température (ambiante) de la pièce. L'ajout de 0.2

ml de chloroforme/ml de Trizol a été effectué à cette étape puis le tout a été mélangé vigoureusement à la main pendant 15 secondes. Une incubation de 15 minutes à température ambiante a été suivie d'une centrifugation de 15 min/12000g/4°C. La phase aqueuse a été recueillie et transférée dans un tube de 1.5ml stérile contenant 0.5 ml d'isopropanol/ml de Trizol. Une incubation de 10 min à température ambiante puis centrifugée 10min/12000g/4°C a succédé à cette étape. Suite à la centrifugation, le surnageant a été retiré et le culot lavé à l'éthanol 70% (1ml) pour aboutir à une centrifugation de 5min/7500g/4°C. Le surnageant a été retiré à l'aide d'une pipette stérile et le culot séché pendant 15 minutes puis resuspendu dans 30 µl d'eau stérile (sans RNase).

Le dosage des ARN a été effectué à l'aide d'un spectrophotomètre avec une  $\lambda$  de 260/280 et un ratio de 2 comme seuil de pureté.

L'intégrité de l'ARN a été estimée à partir d'une migration électrophorétique dans un gel d'agarose 2 % ayant 1 % de formaldéhyde. L'estimation a été effectuée à partir du patron des bandes d'ARNr 18S et 5S.

### 2.9.3. Réaction de réverse transcription

Les ARN totaux ont été quantifiés au spectrophotomètre. Les densités optiques ainsi que les ratios 260/280 ont été collectés. La concentration en ARN total des échantillons a été déterminée grâce à la formule suivante :  $OD_{260} \times 40\text{ng}/\mu\text{l}$ .

La réaction de RT-PCR a été performée en utilisant la MMLV (Invitrogen) comme reverse transcriptase. Le protocole consiste à ajouter 1µl oligodT (500µg/ml), 1µg ARN total, 1µl dNTP (10mM), 9µl H<sub>2</sub>O stérile, et est suivi d'une étape de dénaturation à 65 °C pendant 5 minutes. Une étape de refroidissement sur glace est requise avant d'ajouter 4µl (*5X first strand buffer*), 2µl DTT (0.1M), 1µl RNase Out. 1µl de la MMLV après une période

d'incubation de 2 min à 37 °C a été rajouté. La réaction a été performée à 37 °C pendant 50 minutes et suivie d'une inactivation de 15 minutes à 70°C.

#### 2.9.4. qPCR

La réaction de RT a été diluée (1 : 5) afin de prévenir une inhibition de la réaction de qPCR. Les réactions ont été faites en triplicata technique pour tous les gènes et tous les échantillons dans un volume final de 10 µl. Les réactions qPCR ont été effectuées en utilisant les recettes (1 et 2) suivantes :

Composantes	Reaction 1X
2X TaqMan Mix	5.00µl
Amorces (A et B)	0.05µl
Sonde UPL (dil 1/10)	1.00µl
cDNA (25-50ng/µl)	1.50µl
H2O	2.50µl
<b>Total</b>	<b>10.0µl</b>

**Tableau 4 :** Recette 1. Les différentes composantes de la réaction TaqMan® utilisées pour les gènes sauf pour le gène At2g21200.

Composantes	Réaction 1X
2X Roche	5.00µl
Amorces (A et B)	0.05µl
cDNA (25-50ng/µl)	1.50µl
H2O	3.45µl
<b>Total</b>	<b>10.0µl</b>

**Tableau 5 :** Recette 2. Les différentes composantes de la réaction SYBRGreen® utilisées pour le gène At2g21200.

## **2.10. Expression des gènes rapporteurs**

### **2.10.1. Agro-infiltration des constructions promoteurs : GUS dans *Nicotiana benthamiana***

L'agro-infiltration des constructions promoteurs : GUS et des chimères dans *Nicotiana benthamiana* a été effectuée sous vide. Pour chaque construction, deux plantes de 3 semaines ont été trempées dans un b cher contenant 200 ml d'une culture d'*Agrobacterium tumefaciens* dans du LB – D.O de 0.8 – et 100 M ac tosyringone, dans une cloche à vide pendant 5 minutes. Ensuite, les plantes sont remises en culture pendant 2 jours avant l'induction au BL et la récolte des feuilles. Ces dernières sont broyées dans de l'azote liquide et stockées à -80  C avant l'extraction des protéines.

### **2.10.2. Essai enzymatique de l'activité GUS**

500 mg de tissu végétal (feuilles transformées) ont été récoltées et broyées dans de l'azote liquide. 150 l du tampon d'extraction GUS (50 mM phosphate de sodium pH 7.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.1%SDS, 0.1 Triton X-100, 10 mM à-mercaptoéthanol and 25  l/ml PMSF) ont été rajouté au broyat. Chaque tube a été centrifugé à 15000 rpm pendant 10 minutes à 4 C et ceci a été suivi d'un transfert du surnageant dans un nouveau tube de 1.5 ml préalablement refroidi sur glace.

Pendant ce temps, 198 l du tampon de réaction à une concentration de 1mM (solution stock 25mM de 4-MUG dans du tampon GUS) ont été aliquotés à l'aide d'une multi-pipette dans une plaque 96 puits. L'ajout de 2  l du surnageant dans chaque puits amorce la réaction enzymatique. Au bout de 10 minutes et de 20 minutes, 20 l de chaque

puits ont été transférés dans 180 $\mu$ l (dilution 1 :10) de tampon d'arrêt de la réaction (1M carbonate de sodium) préaliquoté dans une plaque 96 puits noir.

## 3. Résultats

### 3.1. Induction de SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub>

L'expression des protéines SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub> - déterminants mâles de l'auto-incompatibilité sporophytique chez les *Brassicaceae* - dans un système d'expression procaryotique a nécessité l'optimisation des conditions d'induction des constructions pBADgIII®/SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub>, préalablement clonées par l'équipe du Dr. June Nasrallah, l'expression des protéines et la purification des protéines recombinantes.

#### 3.1.1 Optimisation de l'induction

L'induction de la synthèse protéique des constructions pBADgIII®/SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub> par l'arabinose a permis de déterminer la concentration optimale d'induction. On remarque qu'en absence d'arabinose, aucune bande correspondante à la taille attendue de SCR<sub>6</sub> ou de SCR<sub>13</sub> n'a pu être observée (Figure 7 et 8). Ceci est tout à fait normal puisque l'arabinose est un inducteur de l'opéron ARA qui régit la production du fragment cloné dans le vecteur pBADgIII®.

En absence d'arabinose, le promoteur est inhibé par une protéine bactérienne. Il est à noter que l'absence d'arabinose dans le milieu permet une sécrétion basale du gène en amont de l'opéron. L'absence de toute forme de synthèse protéique en manque d'arabinose est expliquée par le fait que le milieu de croissance bactérien contient du glucose. En présence de glucose, le niveau de 3', 5' AMP cyclique est diminué. Par conséquent, une augmentation de la répression de l'opéron par la protéine CRP (*cAMP receptor protein*) est observée (Miyada, Stoltzfus et al. 1984). L'ajout de l'arabinose à différentes concentrations permet un changement conformationnel du répresseur AraC, ce qui modifie l'affinité de ce

dernier (liaison arabinose : répresseur) et enclenche la transcription de l'insert. L'affinité du répresseur AraC est modifiée de sorte qu'elle se lie au site inducteur araI suite à son détachement du site de l'opérateur araO<sub>2</sub>.

On remarque que la concentration qui aboutit à la plus grande production protéique est de 2% et cela, 4 heures suivant l'induction (Figure 7 et 8). L'abondance protéique dans ce cas a été évaluée grâce à la grosseur de la bande (intensité). On remarque aussi que la diminution de la synthèse protéique est proportionnelle à la diminution de la concentration en arabinose dans le milieu.

En conclusion, cette expérience nous a permis de déterminer la concentration optimale d'arabinose 2% pour SCR<sub>6</sub> et 0.2% pour SCR<sub>13</sub> pour les expériences subséquentes de purification des protéines et l'utilisation de celles-ci dans le biotest d'activité.

### 3.1.2. Choc osmotique

Les gènes correspondants aux protéines SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub> – ligands des récepteurs *S-locus receptor kinase*- ont été clonés dans le vecteur pBADgIII® ayant un signal de sécrétion périplasmique. Le signal de sécrétion périplasmique pIII est une protéine (18 aa) de la capsid du phage filamenteux fd (Boeke and Model 1982; Rapoza and Webster 1993). Les protéines, ainsi induites par l'arabinose, seront acheminées dans le périplasme bactérien. Ce dernier représente l'espace entre la membrane cytoplasmique et le peptidoglycane de la paroi bactérienne. La libération des protéines induites et acheminées vers le périplasme est effectuée grâce à un choc osmotique des cellules. Ce choc osmotique permet, entre autres, de voir si les produits des gènes clonés sont solubles ou non. Les protéines insolubles auront tendance à former des corps d'inclusion dans les bactéries. Le but de nos expériences est de produire les protéines SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub> sous une forme soluble



afin de faciliter la purification et la conservation de leur capacité catalytique. En d'autres termes, il s'agit de conserver leur capacité de déclencher une réaction d'auto-incompatibilité.

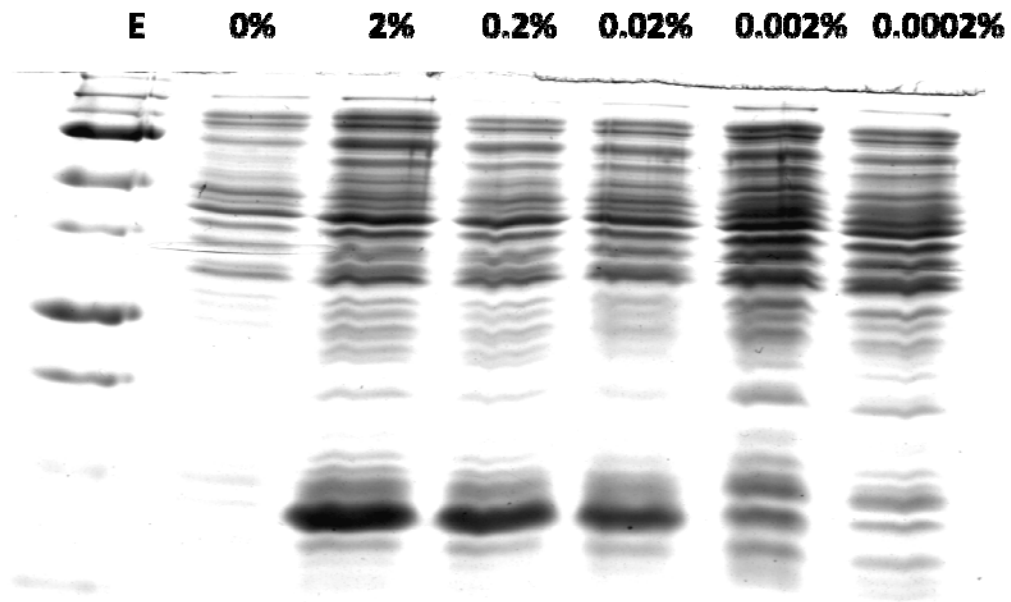
Les résultats ainsi obtenus après choc osmotique démontrent que les protéines sont secrétées et qu'une partie des protéines reste sous une forme insoluble (Figure 9 et 10). Ceci peut être expliqué par une surexpression de la synthèse des protéines (Hartley and Kane 1988; Fahnert, Lilie et al. 2004) se traduisant par une accumulation au niveau des corps d'inclusion. Une autre explication serait l'incapacité des bactéries à assurer un repliement dimensionnel parfait pour toutes les protéines induites par l'arabinose.

### 3.2. Purification de SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub>

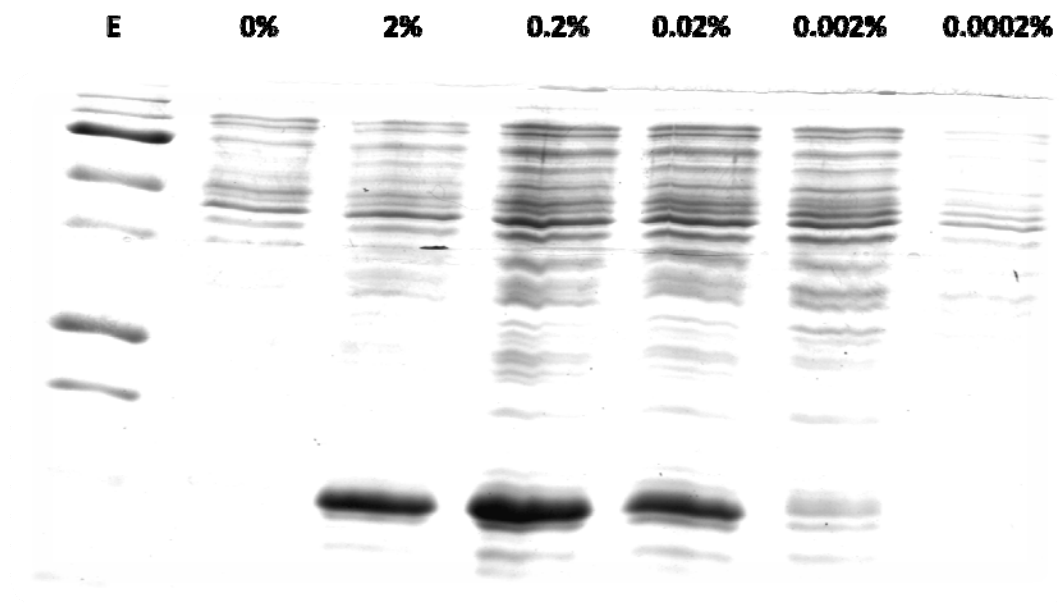
Le but de cette expérience est de purifier une quantité suffisante de protéines SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub> pour permettre l'évaluation de l'activité de celle-ci dans un système *in vivo*. Dans un premier temps, l'activité des protéines SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub> est évaluée vis-à-vis de l'induction de l'auto-incompatibilité dans un système de *Brassica olearaceae*. Dans un deuxième temps, les protéines sont utilisées afin de démontrer le concept du bioessai développé. Ainsi, l'ajout de SCR<sub>6</sub> dans une plaque contenant des cellules qui expriment la chimère SRK<sub>6</sub>:BRI1 activerait la voie des brassinolides. Cette activation se traduirait par un relais du signal vers le promoteur d'un gène BL spécifique - sélectionné suite à des études d'expressions- fusionné au gène rapporteur codant pour la  $\beta$ -glucorinidase (GUS). L'expression de la  $\beta$ -glucorinidase permet l'hydrolyse du substrat - MUG ou X-Gluc dépendamment des méthodes de détections - ce qui se manifeste par une coloration bleue ou une émission de la fluorescence permettant ainsi de prouver la validité du concept du bioessai développé.

Les gènes codant pour les protéines SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub> ont été clonés dans le vecteur pBADgIII® - un vecteur permettant le double étiquetage des protéines exprimées sous le contrôle du promoteur ARA- permettant ainsi de produire des protéines exprimant une queue de six histidines en C-terminal. Cette queue permet la liaison de la protéine à l'ion nickel des billes d'affinité (Ni-sepharose). Suite à la purification, les protéines ont été analysées par immunobuvardage de type Western (Figure 11). L'analyse par Western des protéines du surnageant libérées suite au choc osmotique montre la présence d'une quantité moyenne des protéines à l'étude. La détection des celles secrétées par Western Blot révèle deux bandes à 8kDa et 16kDa respectivement (Figure 11). En effet, la bande à 8kDa correspond à une détection spécifique des protéines recombinantes tandis que la bande à 16 kDa correspond soit à une détection non spécifique, soit aux conditions de stringence du Western Blot.

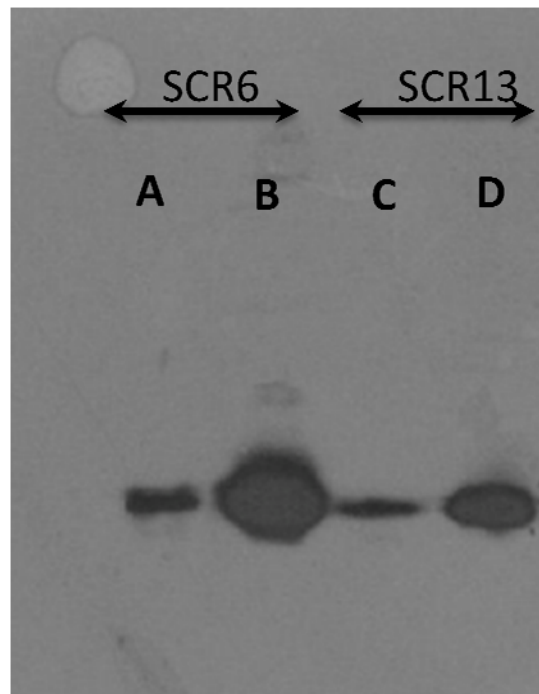
Dans le but de s'assurer que les protéines purifiées correspondent aux protéines SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub> et non à des protéines d'origine bactérienne, les bactéries TOP10 non transformées (témoin négatif) ont été analysées sur le même gel. L'absence de toute forme de protéines indique que la bande à 16kDa ne correspond probablement pas à une détection non spécifique des protéines bactériennes mais plutôt aux conditions de stringence du western.



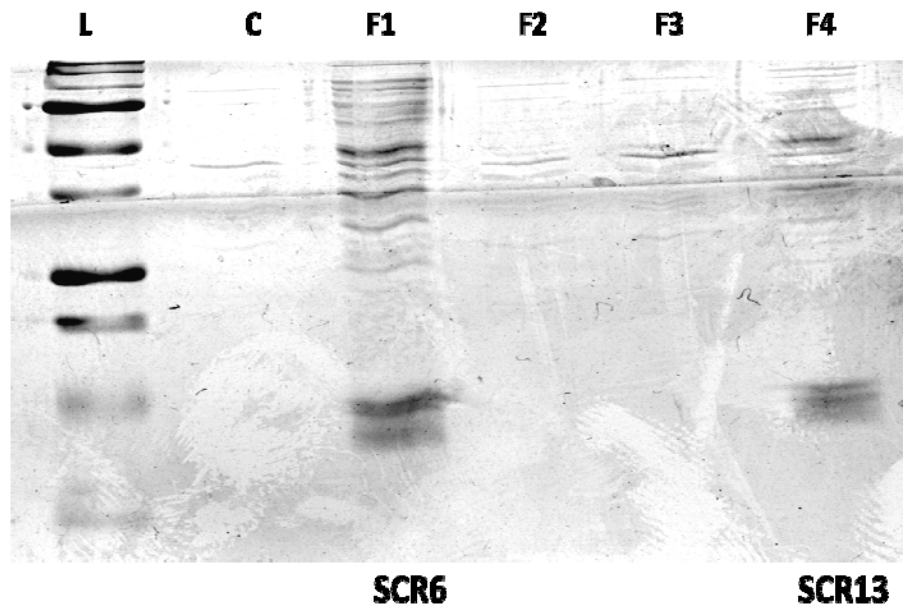
**Figure 7 :** Optimisation des concentrations d'induction des bacteries TOP10 transformées avec la construction pBADgIII :SCR<sub>6</sub>. Gel SDS-PAGE des protéines totales 4h post-induction avec différentes concentrations d'arabinose. E= échelle



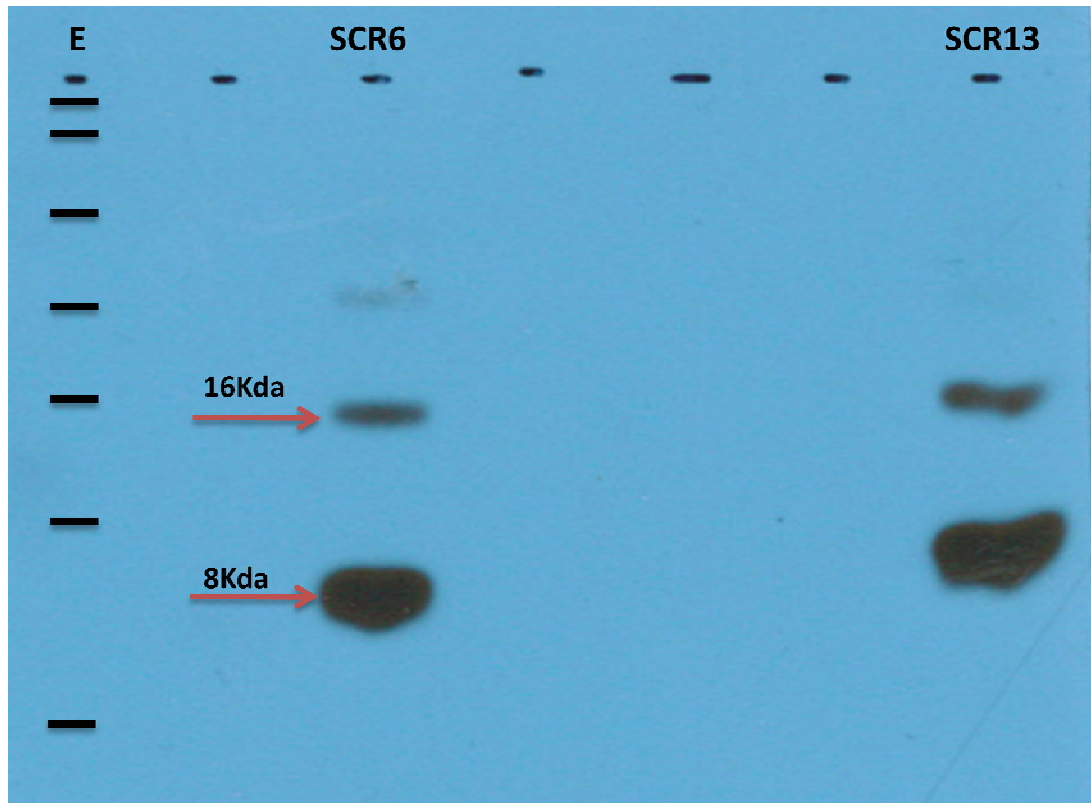
**Figure 8 :** Optimisation des concentrations d'induction des bacteries TOP10 transformées avec la construction pBADgIII :SCR<sub>13</sub>. Gel SDS-PAGE des protéines totales 4h post-induction avec différentes concentrations d'arabinose. E= échelle.



**Figure 9 :** Immunobuvardage de type western des protéines SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub> retrouvées dans le culot bactérien et dans le surnageant suite au choc osmotique. A et C = surnageant. B et D = culot.



**Figure 10 :** Électrophorèse sur gel SDS-PAGE des différentes fractions du surnageant suite au choc osmotique. L= échelle. C= contrôle (bactérie non transformée). F1 et F4= après ajout de la solution B (20 mM Tris-HCl, 2.5 mM EDTA). F2 et F3= après ajout de la solution A (20 mM Tris-HCl, 2.5 mM EDTA, 20% sucrose). Les solutions A et B ont été ajoutées afin d'induire un choc osmotique des cellules.



**Figure 11 :** Immunobuvardage de type Western des cellules TOP10 transformées avec pBADgIII/SCR<sub>6</sub> et pBADgIII/SCR<sub>13</sub> suite à un choc osmotique.

### 3.3. Génotypages des plantes *Brassica oleracea* S<sub>6</sub>S<sub>6</sub> et S<sub>13</sub>S<sub>13</sub>

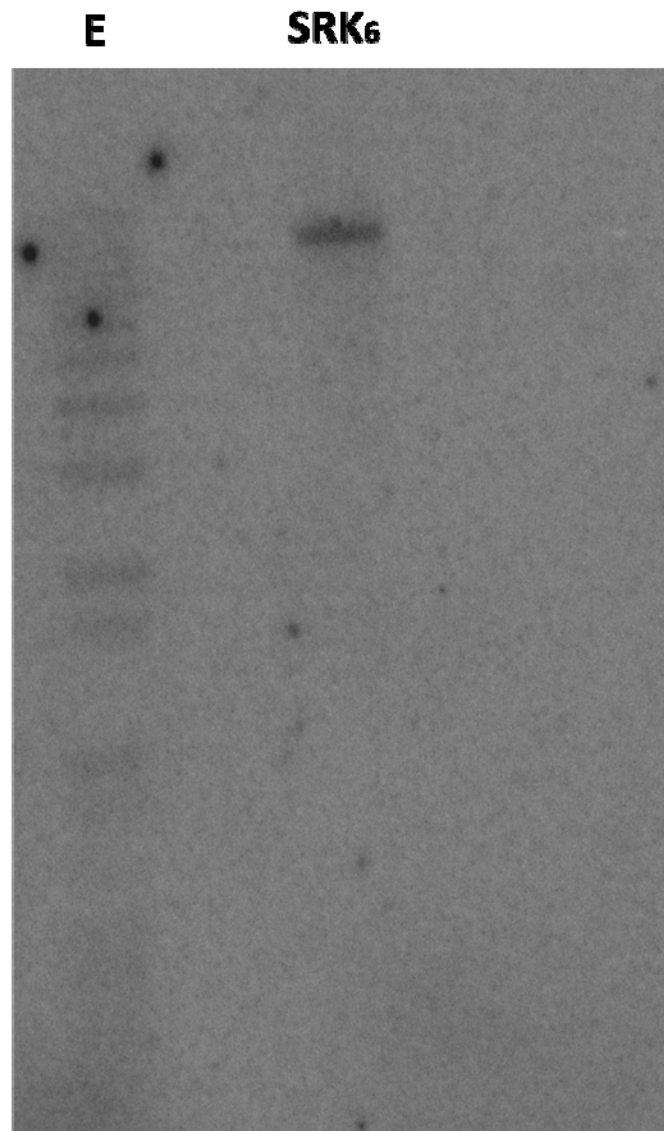
L'auto-incompatibilité sporophytique se manifeste lors de la reconnaissance du soi et aboutit à un rejet de la croissance pollinique. Dans le but de tester l'activité des protéines recombinantes SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub> à induire l'auto-incompatibilité, un système de reconnaissance s'avère primordial. Des graines de *Brassica oleracea* ayant l'haplotype S<sub>6</sub>S<sub>6</sub> et S<sub>13</sub>S<sub>13</sub> ont été fournies par Dr. June Nasrallah afin de démontrer l'activité des protéines recombinantes à induire une réponse d'auto-incompatibilité. Dans l'espoir de confirmer le génotype S<sub>6</sub>S<sub>6</sub> et S<sub>13</sub>S<sub>13</sub> de ces plantes, nous avons performé une étude de type Southern. Ce type d'analyse permet, entre autres, de déterminer le nombre de copies d'un gène spécifique dans le génome. Par contre, cette analyse ne permet pas de déterminer l'homozygotie.

Nos résultats démontrent que dans des conditions d'hybridation de haute stringence, l'hybridation de la sonde spécifique au récepteur SRK<sub>6</sub> au niveau du génome des plantes S<sub>6</sub>S<sub>6</sub>, et non au niveau du génome des plantes S<sub>13</sub>S<sub>13</sub>, reflètent une très haute spécificité de la sonde. De plus, on remarque la présence d'une seule bande, ce qui concorde parfaitement avec la littérature où le gène SRK<sub>6</sub> se retrouve en une seule copie dans le génome des plantes *Brassica oleracea* (Figure 12). De même, l'utilisation d'une sonde spécifique au gène SCR<sub>13</sub> permet de caractériser le génotype des plantes S<sub>13</sub>S<sub>13</sub> reçues dans notre laboratoire. Nos résultats démontrent encore une fois la présence d'une seule bande de haute spécificité indiquant l'exactitude du génotype des plantes S<sub>13</sub>S<sub>13</sub> (Figure 13).

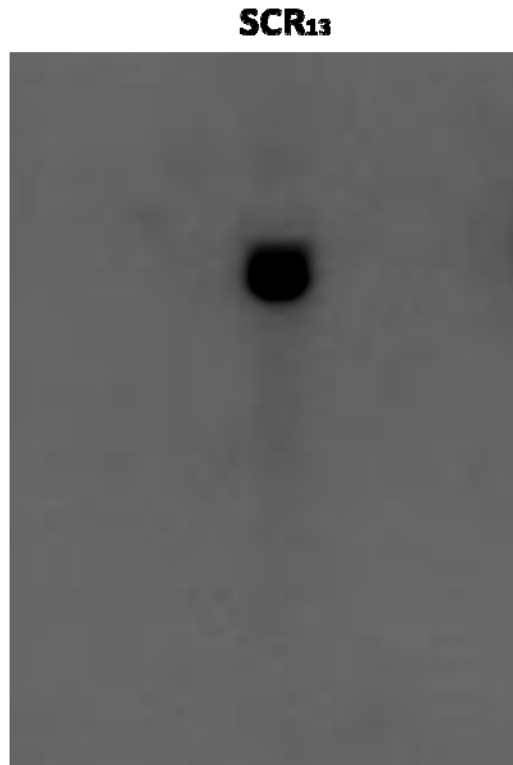
Bien qu'on puisse stipuler l'homozygotie des plantes due à la très haute spécificité de l'hybridation des sondes SRK<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub>, il est préférable de refaire l'expérience dans des conditions de basse stringence. Dans ces nouvelles conditions, la présence de plusieurs bandes pourrait indiquer une hybridation non spécifique à un différent haplotype ayant une



haute similarité avec  $S_6S_6$  ou  $S_{13}S_{13}$ . De plus, ces expériences devraient être complétées par des réactions de RT-PCR afin de mieux démontrer l'homozygotie des plantes.



**Figure 12 :** Gènotypage des plantes ayant l'haplotype S<sub>6</sub>S<sub>6</sub> par la méthode de Southern. La sonde radioactive utilisée est spécifique à la séquence du gène codant pour le récepteur SRK<sub>6</sub>.



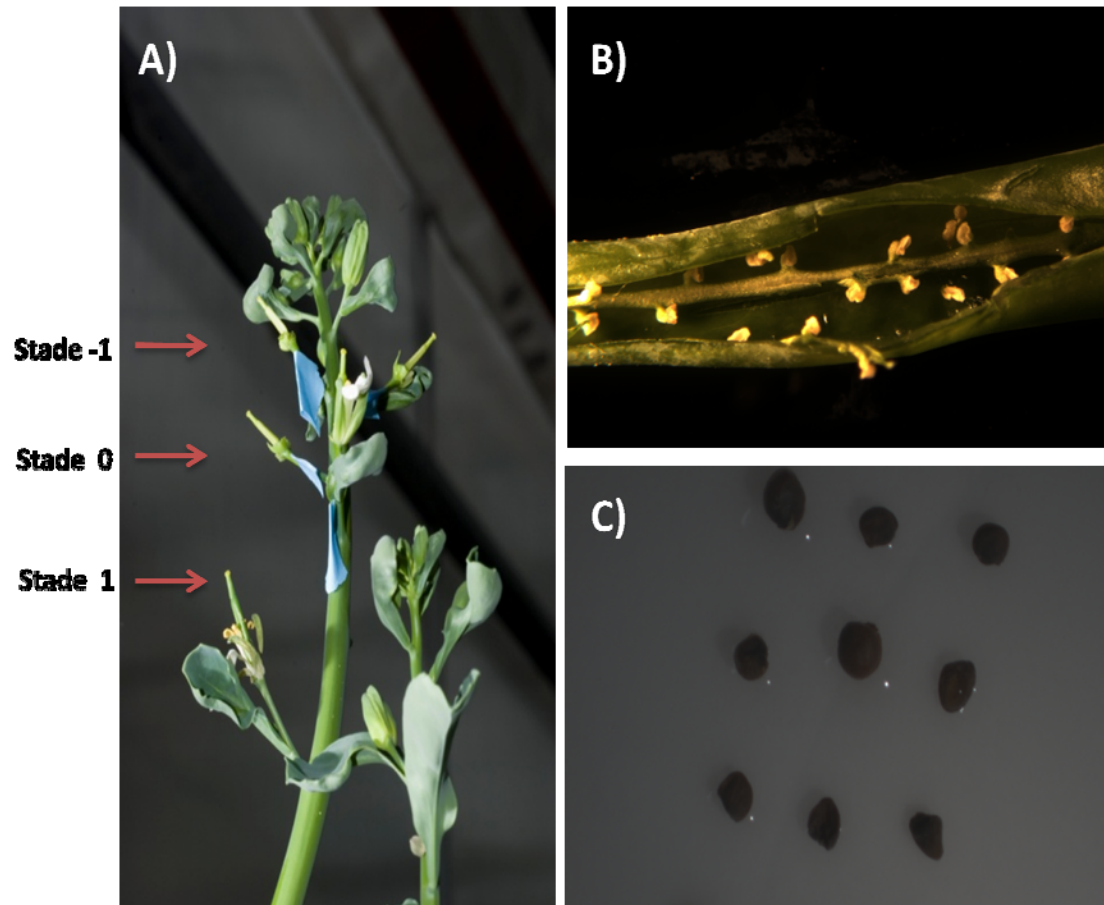
**Figure 13 :** Génomage des plantes ayant l'haplotype S<sub>13</sub>S<sub>13</sub> par la méthode de Southern. L'ADN génomique des plantes *Brassica* S<sub>13</sub>S<sub>13</sub> a été digéré avec l'enzyme de restriction EcoRI. La sonde radioactive utilisée lors de l'hybridation sur membrane est spécifique à la séquence du gène codant pour la protéine SCR<sub>13</sub>.

### 3.4. Biotest d'activité

Le but de cette expérience est d'évaluer l'activité des protéines recombinantes SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub> purifiées dans l'induction de l'auto-incompatibilité sporophytique dans *Brassica olearacea*. Ceci permettra l'utilisation de ces protéines dans la démonstration de la validité du concept du bioessai en développement décrit dans ce mémoire. Dans un premier temps, des tests de fécondation ont été performés pour déterminer les stades de développement du système d'auto-incompatibilité chez les haplotypes S<sub>6</sub>S<sub>6</sub> et S<sub>13</sub>S<sub>13</sub> des plantes de *Brassica olearacea* reçues du laboratoire du Dr. June Nasrallah, Université Cornell. Ces études nous ont d'abord permis de générer des graines pour chaque haplotype afin de préserver la culture des plantes (Figure 14- A, B et C) puisque les quantités de graines reçues sont insuffisantes pour des études dans le futur (~5 graines/plantes; 1 graine viable). Ensuite, ces études nous ont permis de déterminer à quel stade de développement des fleurs l'auto-incompatibilité sporophytique est déclenchée. Cette information est essentielle pour réussir les biotests d'activité des protéines SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub> recombinantes.

Dans un deuxième temps, les tests de bio-activité ont été performés sur les fleurs au premier stade de l'apparition de l'auto-incompatibilité. Le premier stade se décrit par des fleurs compatibles ayant un stigma de 7mm. L'ajout des protéines SCR<sub>6</sub> sur le stigma de fleurs ayant un haplotype S<sub>6</sub>S<sub>6</sub> devrait déclencher l'auto-incompatibilité et empêcher toute fécondation par du pollen de type S<sub>13</sub>. En revanche, le traitement des stigmas S<sub>6</sub>S<sub>6</sub> avec le déterminant mâle de l'incompatibilité de l'haplotype S<sub>13</sub>S<sub>13</sub> permet au pollen ayant un haplotype S<sub>13</sub> de féconder les stigmas S<sub>6</sub>S<sub>6</sub>. Nos résultats montrent que l'ajout des protéines recombinantes purifiées S<sub>6</sub>S<sub>6</sub> sur un stigma S<sub>6</sub>S<sub>6</sub> a permis de déclencher l'auto-incompatibilité sporophytique se traduisant par une inhibition de la croissance pollinique S<sub>13</sub> (Figure 15, Tableau 6). En contre partie, le traitement des stigmas S<sub>6</sub>S<sub>6</sub> avec le déterminant mâle S<sub>13</sub>S<sub>13</sub> permet au pollen ayant un haplotype S<sub>13</sub> de féconder les stigmas

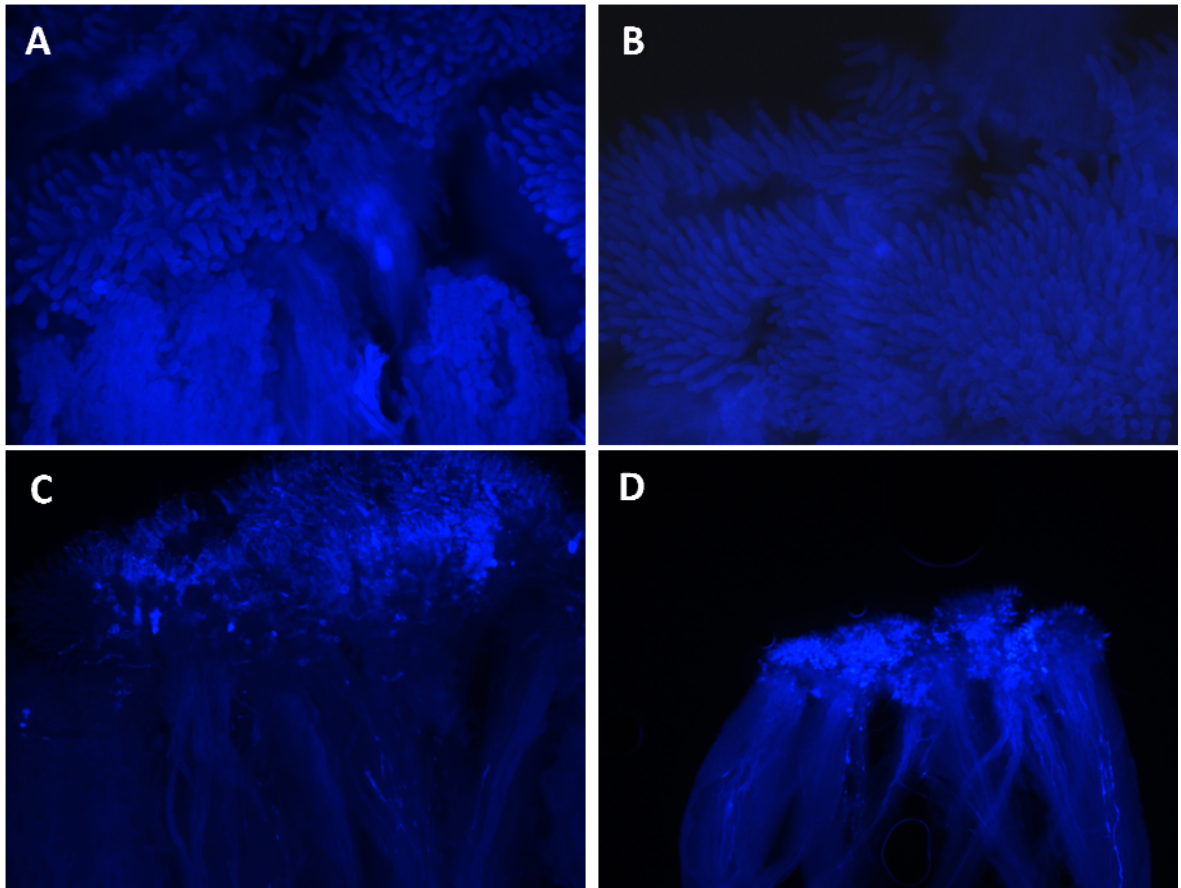
S<sub>6</sub>S<sub>6</sub> (Figure 15, Tableau 6). Ces résultats démontrent que les protéines SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub> purifiées ont conservé leur capacité à lier leurs ligands SRK respectifs.



**Figure 14 :** Génération de graines à partir de lignées auto-incompatibles de *Brassica*. A) Plantes matures à différents stades de développement stigmatique. Le stade -1 correspond au stade de développement le moins évolué tandis que le stade 1 correspond au stade de développement où le stigma est auto-incompatible. B) Silique issue d'un croisement auto-incompatible  $S_6S_6 \times S_6S_6$  démontrant ainsi l'auto-incompatibilité de ces plantes. C) Graines issues d'un croisement  $S_6S_6 \times S_6S_6$ . Les stigmas immatures (Stade-1) de plantes auto-incompatibles  $S_6S_6$  ont été pollinisées avec du pollen  $S_6S_6$  provenant de pistils matures.

Génotype du Stigma	SCR purifié	Pollen	Croissance du tube pollinique
$S_6S_6$	$SCR_6$	$S_{13}S_{13}$	Non
$S_6S_6$	$SCR_{13}$	$S_{13}S_{13}$	Oui
$S_{13}S_{13}$	$SCR_6$	$S_{13}S_{13}$	Oui
$S_{13}S_{13}$	$SCR_{13}$	$S_{13}S_{13}$	Non

**Tableau 6 :** Tableau résumant les résultats du biotest d'activité des protéines recombinantes  $SCR_6$  et  $SCR_{13}$ .



**Figure 15 :** Bioessai d'activité de protéines recombinantes  $SCR_6$  et  $SCR_{13}$ . A)  $rSCR_6$  + stigma  $S_6S_6$  + Pollen  $S_{13}S_{13}$ . B)  $rSCR_{13}$  + stigma  $S_{13}S_{13}$  + Pollen  $S_6S_6$ . C)  $S_6S_6$  + Pollen  $S_{13}S_{13}$ . D)  $S_{13}S_{13}$  + Pollen  $S_6S_6$ .  $rSCR$  =  $SCR$  recombinant



### **3.5. Quantification des gènes induits aux brassinolides**

#### **3.5.1. Identifications des gènes induits aux brassinolides**

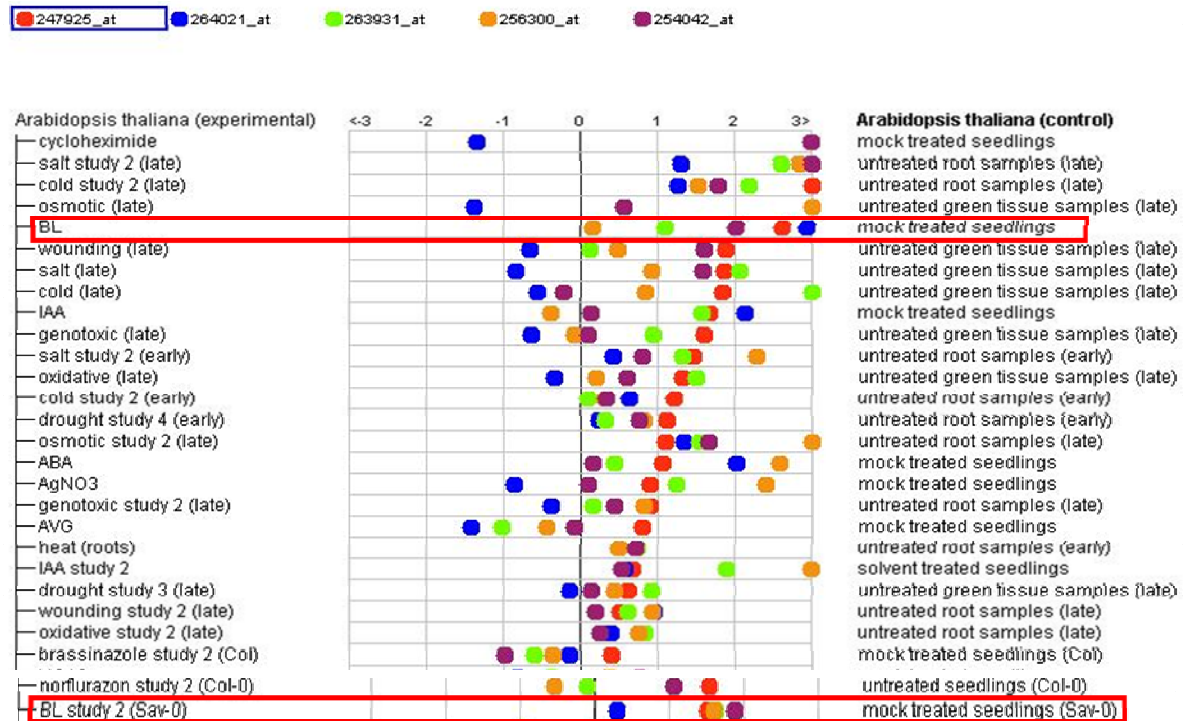
La construction d'un rapporteur inductible par la voie des brassinostéroïdes requiert, avant tout, l'identification des gènes induits par la voie des brassinostéroïdes suivie par l'identification des promoteurs associés à ces gènes. Une fois les gènes et leurs promoteurs identifiés, le clonage de ceux-ci en amont du rapporteur devient une étape importante pour la réussite de la stratégie élaborée pour démontrer la faisabilité du bioessai. Dans un premier temps, les gènes induits par la voie des brassinolisteroïdes ont été identifiés par une revue de littérature comparative et par des analyses bioinformatiques de type méta-analyse sur des données de biopuce. Dans un deuxième temps, les expériences de quantification en temps réel de ces gènes ont permis de vérifier leur expression et de distinguer le promoteur le plus fort parmi la sélection. En d'autres termes, ces expériences permettent de discriminer les promoteurs qui expriment le mieux en présence du signal d'activation de la voie des brassinostéroïdes.

L'analyse des données de Goda et al. (Goda, Shimada et al. 2002) permet d'identifier cinq gènes surexprimés par la voie des BL selon le critère de surexpression suivant : facteur de multiplication de l'expression  $> 1.8$ . L'analyse comparative entre ces données (Goda, Shimada et al. 2002) et ceux de Müssig et al. (Mussig, Fischer et al. 2002) nous mène à regrouper les deux gènes que celles-ci ont en commun (Tableau 7). L'analyse bioinformatique de type méta a permis de confirmer la surexpression des cinq gènes choisis (Figure 15). On remarque une différence dans le niveau de surexpression entre les données de Goda et al. et ceux retrouvées sur les bases de données permettant la méta analyse. Par exemple, le gène At1g69490 présente un facteur de multiplication de 0.5 lors de la méta-analyse contrairement à une valeur de 2 présentée par Goda et al.

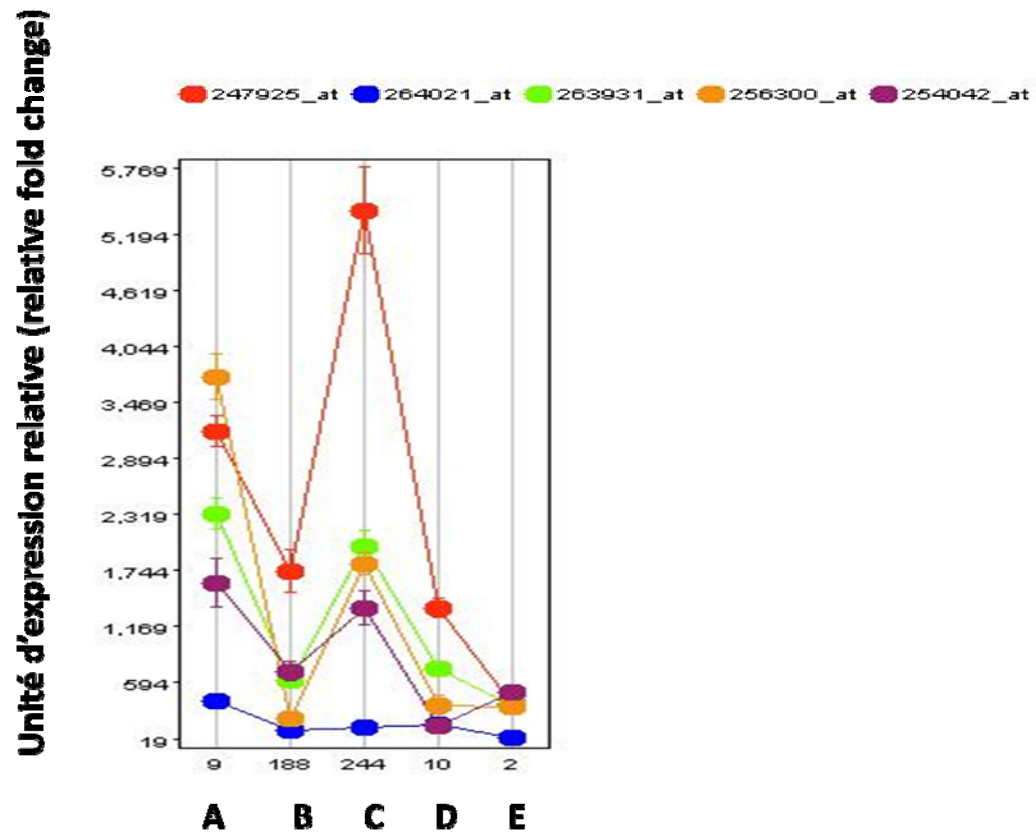
On remarque aussi une différence au niveau de l'expression des gènes choisis selon la base de données Affimetrix™. Par exemple, une différence logarithmique de 1,2 pour le gène At2g21200 entre l'étude BL et l'étude BL 2 est observée (Figure 15). Cette différence peut être expliquée par des dissimilarités au niveau des variables expérimentales – concentration de BL, stade de développement – utilisées lors de ces études. De ce fait, l'utilisation des cinq gènes pour vérifier leur surexpression par qPCR, à un stade de développement donné, a été effectuée.

Gène	Nom	Goda et al	Müssig et al
<b>At5g57560</b>	Touch induced TCH4	6.5	3.2
<b>At2g21200</b>	Auxin response protein	2.3	2.1
<b>At2g36220</b>	Unknown protein	2.2	N/A
<b>At1g69490</b>	NAC transcription factor	1.8	N/A
<b>At4g25810</b>	xyloglucan endotransglycosylase-related (XTR6)	5.5	N/A

**Tableau 7 :** Tableau comparatif des gènes surexprimés par la voie des brassinostéroïdes selon les études de Goda et al et ceux de Müssig et al. Non applicable = N/A.



**Figure 16 :** Méta-analyse des cinq gènes choisis selon l'étude de Goda et *al.* face aux différents stimuli. Les données de méta-analyse ont été générées par le logiciel Genevestigator® en utilisant des bases de données issues d'études de biopuces à ADN.

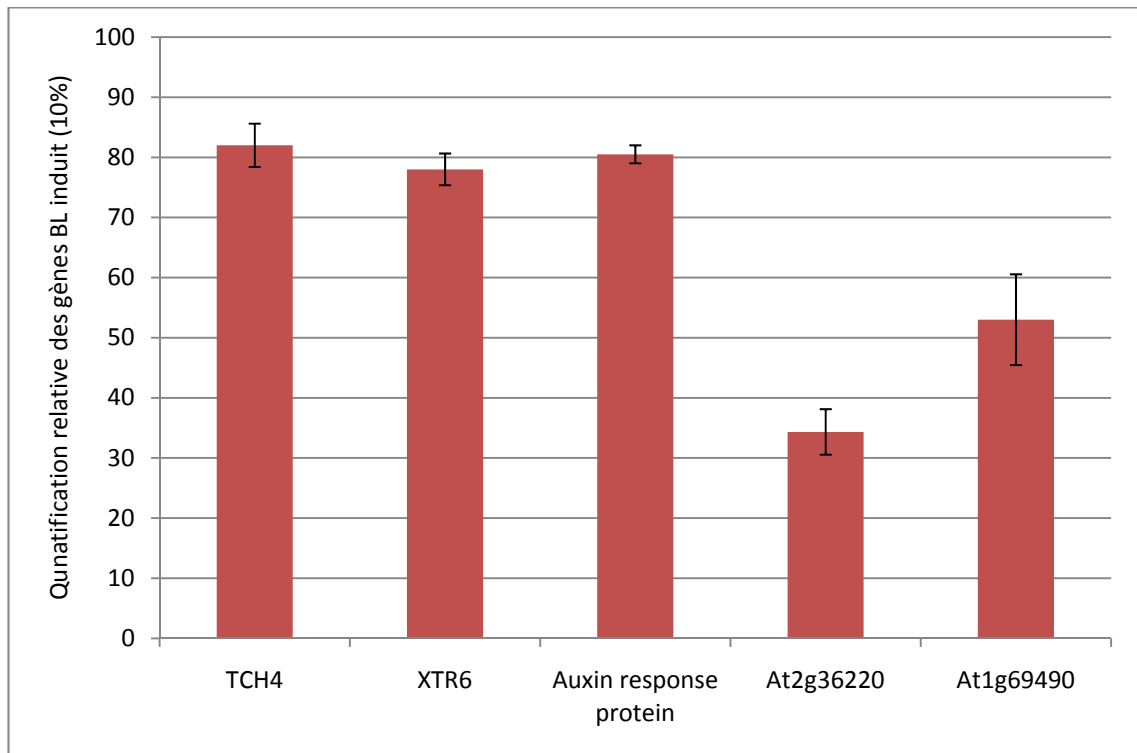


**Figure 17 :** Expression des cinq gènes choisis à différents stade de développement chez *Arabidopsis thaliana*. A) Graines au stade de germination. B) Plantules. C) Jeunes rosettes. D) Boulting . E) Fleures

### 3.5.2. Quantification des gènes induits aux brassinolides

La quantification des gènes identifiés dans la revue de littérature et par méta-analyse a été performée sur des plantules de 10 jours induites avec 10 $\mu$ M de brassinolides afin de reproduire les mêmes variables expérimentales utilisées par les études de biopuce par Goda et al 2002 (Goda, Shimada et al. 2002).

Nos résultats démontrent que les cinq gènes sont effectivement surexprimés par la voie des brassinolides et que les gènes encodant pour les protéines TCH4, XTR6 et *Auxin response protein* se présentent comme de meilleurs candidats pour notre étude. Ces gènes présentent une augmentation de ~80% comparativement au contrôle non traité. Par contre, les gènes At2g36220 et At1g69490 présentent une augmentation de 37% et 54% respectivement. Cette augmentation de l'expression est observée une heure post traitement indiquant ainsi que les gènes sélectionnés répondent rapidement suite à l'ajout de BL. Une petite/faible amélioration du signal de surexpression a été observée 2 h et 3 h post traitement. La comparaison entre les différents temps d'induction de la réponse permet d'identifier le temps optimal de celle-ci et d'en faire usage lors des tests sur les différentes constructions promoteur : rapporteur.



**Figure 18 :** Diagramme en battons de la surexpression relative des gènes sélectionnés et induits aux BLs.

### **3.6. Construction des promoteurs : rapporteurs**

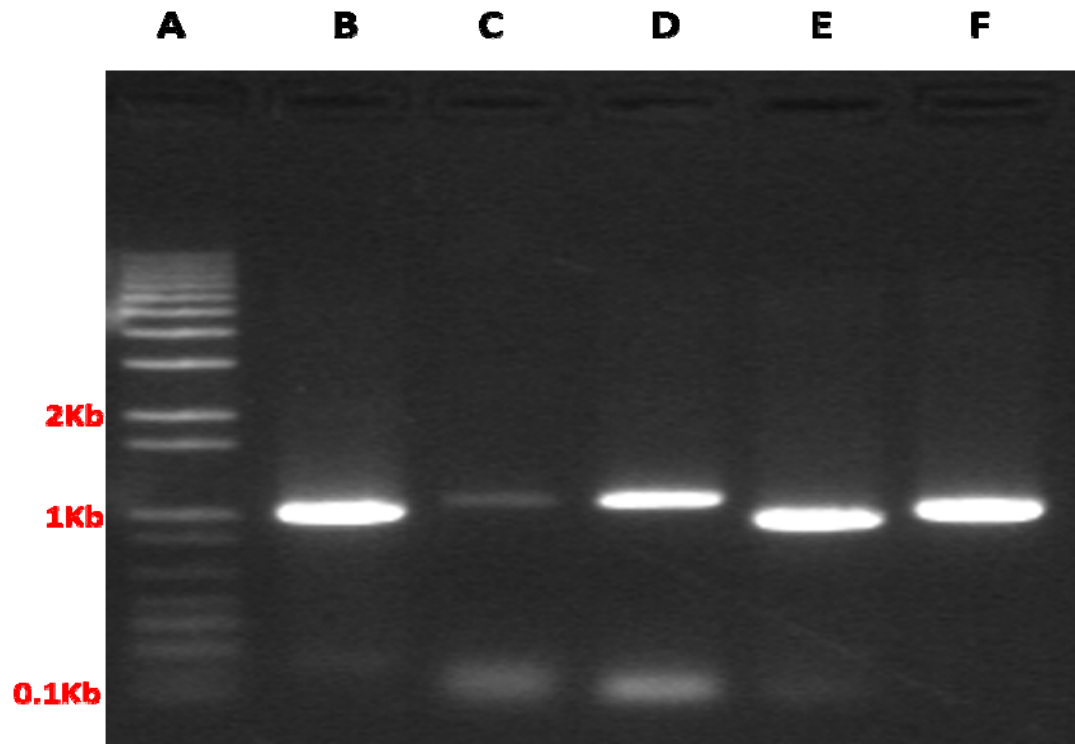
#### **3.6.1. Amplification des séquences promotrices et clonage dans le vecteur pMDC162**

Dans un premier temps, l'amplification par PCR des fragments d'ADN correspondant aux séquences promotrices des gènes surexprimés par la voie des brassinostéroïdes a été effectuée à partir de l'ADN génomique extrait des plantules âgées de 14 jours en utilisant les amorces sens et anti-sens portant respectivement les sites de recombinaison Attb1 et Attb2 du système Gateway™. L'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose, après coloration au bromure d'éthidium des produits amplifiés par PCR, montre des fragments d'ADN de tailles différentes variant entre 900 et 1100 pb (Figure 19), ce qui correspondrait aux fragments contenant les séquences promotrices des gènes surexprimés par les brassinostéroïdes.

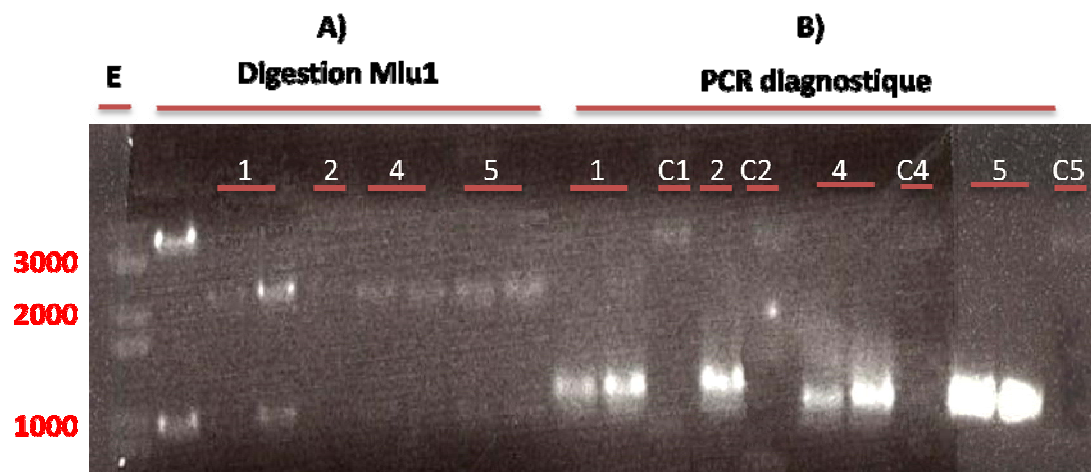
Par la suite, les fragments ont été purifiés puis clonés dans le vecteur d'entrée universel pZeo grâce à la BP clonase, une recombinaise spécifique. Cinq plasmides recombinants, choisis au hasard pour chaque séquence promotrice, ont été digérés par l'enzyme de restriction Mlu. Les produits de digestion ont été ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose et par PCR diagnostique en utilisant les amorces spécifiques pour chaque construction. La digestion des constructions avec l'enzyme MluI permet de libérer le fragment cloné et une bande de 2175 pb. L'analyse sur gel d'agarose montre que la digestion des plasmides recombinant pZeo/promoteur entraîne la libération de fragments d'ADN entre 900 et 1100 pb dépendamment de la séquence promotrice clonée (Figure 20). Le séquençage des plasmides recombinant a permis de confirmer que les plasmides renferment bel et bien les séquences promotrices des gènes surexprimés par les brassinolides, déterminés par les études de PCR en temps réel.



Dans un deuxième temps, les séquences promotrices ont été clonées dans le vecteur de destination finale, pMDC162, contenant le gène rapporteur codant pour l'enzyme GUS. Le clonage a été effectué grâce à une réaction de recombinaison des séquences Attp1 et Attp2 médiée par une recombinase spécifique, la LR clonase. Deux plasmides recombinants, choisis par hasard pour chaque construction, ont été analysés grâce à une PCR diagnostique et par séquençage. Le séquençage des constructions nous a permis de vérifier si le clonage a été effectué *in frame*. De plus, l'alignement et la comparaison des séquences clonées dans le vecteur final avec celles obtenues sur les banques de données ont montré que ces dernières sont 100% homologues.



**Figure 19 :** Amplification des promoteurs des cinq gènes induits aux BL par PCR en utilisant des amorces spécifiques aux régions (~ 1000 pb) en aval des gènes choisis (5'et 3' UTR). La migration des produits de PCR est effectuée sur un gel 1%. A) 1Kb plus. B) At2g36220. C) At2g21200. D) At5g57560. E) At4g25810. F) At1g69490



**Figure 20 :** Analyse des clones pZeo : promoteurs positifs par cartographie de restriction et PCR diagnostique. A) Cartographie de restriction par Mlu1. B) PCR diagnostique sur les plasmides pZeo : promoteurs BL induits en utilisant des amorces séquences spécifiques. E= échelle; C = control (pZeo : promoteur amplifié avec les amorces spécifiques)

### 3.7. Tests d'activité des promoteurs : rapporteurs

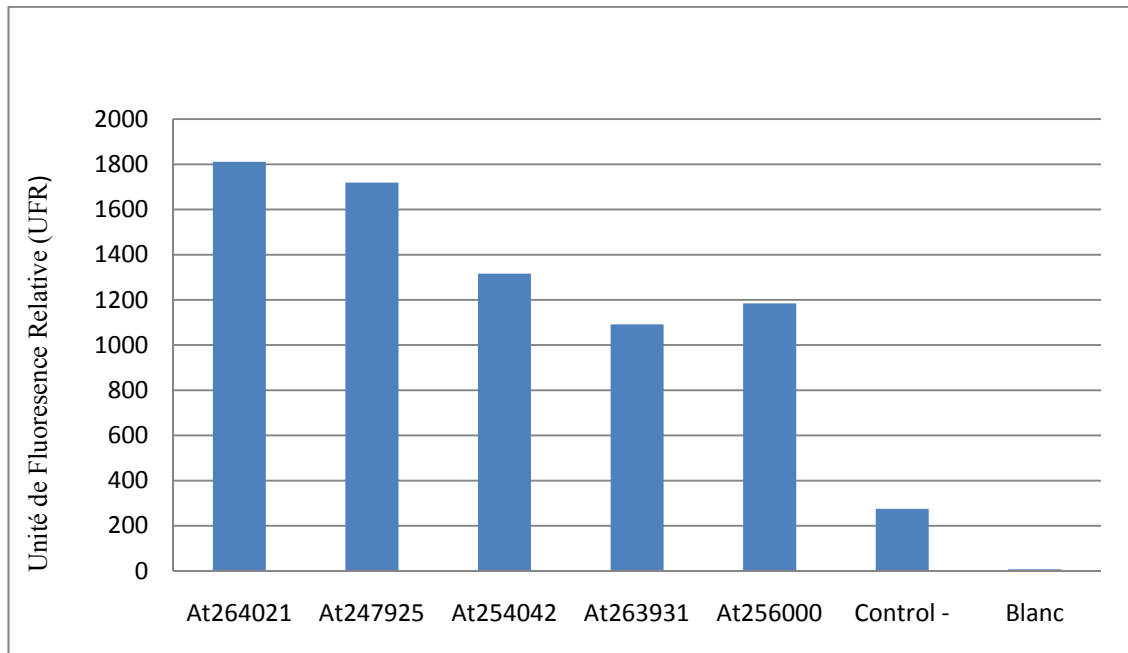
#### 3.7.1. Tests d'activités des promoteurs : rapporteurs transformés dans le système d'expression de *Nicotiana benthamiana*.

Les promoteurs des gènes surexprimés par la voie des brassinolides ont été utilisés dans le but de construire un système rapporteur régi par les facteurs de transcription entrant dans la voie d'activation par les brassinostéroïdes. Ceci dit, une fois activée, la chimère SRK<sub>6</sub> : BRI1 induit un signal pouvant réguler l'activation du gène rapporteur encodant la  $\beta$ -glucorinidase (GUS). Cette activation est due à la fusion d'un promoteur de gène induit-identifié dans la section 4 - par la voie des brassinolides avec le rapporteur. Une fois activée, le promoteur régit l'expression de la  $\beta$ -glucorinidase.

Le système d'expression de *Nicotiana benthamiana* a été utilisé afin de vérifier l'expression ainsi que l'activité des différentes constructions promoteurs : rapporteurs. Pour ce faire, ces dernières ont été transformées dans la souche C58C1 d'*Agrobacterium tumefaciens* puis agro-infiltrées – deux plantes / construction – sous vide, et cela, pendant cinq minutes. Par la suite, les plantes de tabac ont été cultivées pendant deux jours afin de permettre la récupération des plantes face au stress induit lors de la transfection. Puis, un premier lot de plantes – une plante par construction – a été récolté et les feuilles ont été broyées dans de l'azote liquide. Un deuxième lot de plantes – une plante par construction – a été induit avec 10mM de BL pendant 30 min, 1 h et 3 h en vue de permettre l'étude de la cinétique d'expression du rapporteur.

Les tests d'activité enzymatique effectués sur le premiers lot de plantes – lot ayant été induit pendant l'agro-infiltration des constructions – démontrent une expression des constructions, deux jours suivant l'induction. L'activité est la plus haute au niveau des

promoteurs codant pour les protéines XTR6, TCH4 et *Auxin response protein*, comparativement aux promoteurs des gènes At2g36220 et At1g69490 (Figure 21). Lors de l'induction des plantes transformées avec 10 mM de BL, on observe une augmentation de l'expression du gène rapporteur dans le temps. Cette augmentation est optimale une heure après l'induction et atteint un plafond 3 h post traitement. Ces résultats concordent avec les études de qPCR de la section 3 de ce mémoire. Lors de la comparaison de l'expression du gène rapporteur entre le lot de plantes transformées et non induites (lot #1) et ceux induites aux BL, on remarque une augmentation de l'expression d'un facteur de 6 entre le contrôle et le gène le plus exprimé. L'expression au niveau des plantes non induites représente soit une expression basale des constructions promoteurs : rapporteurs soit une fluorescence basale des métabolites secondaires.



**Figure 21 :** Tests d'activités des promoteurs : rapporteurs construits puis transformés dans le système d'expression de *Nicotiana benthamiana*.

### 3.8. Clonage du gène BRI1 dans le vecteur pBlueScriptII (+)

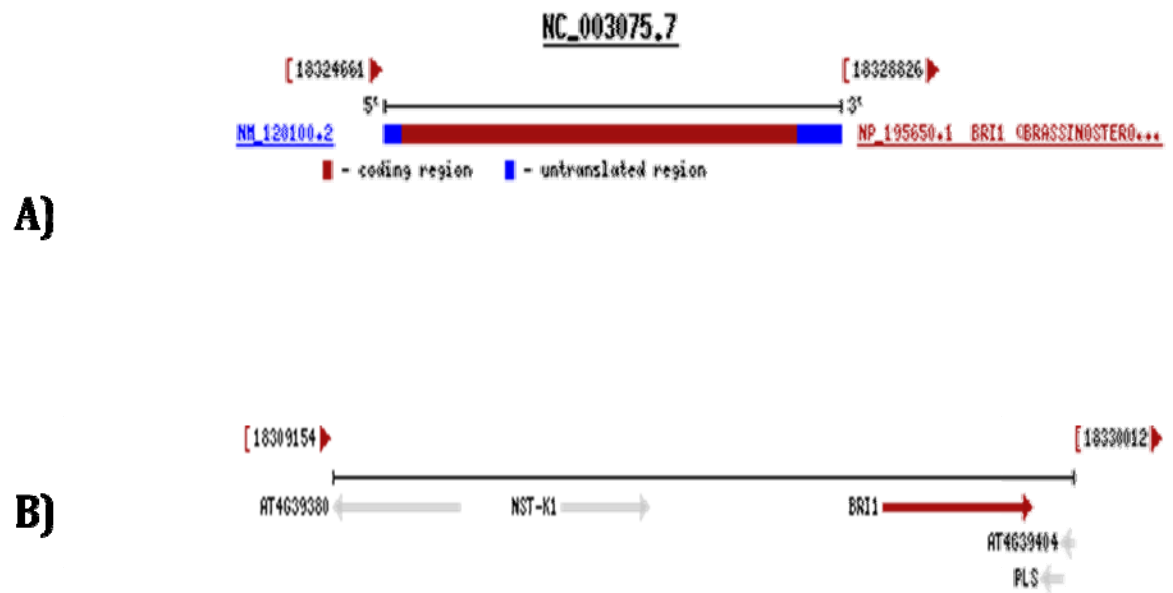
La construction des chimères SRK<sub>6</sub> : BRI1 nécessite dans un premier lieu le clonage du gène codant pour la protéine BRI1 dans un vecteur d'amplification tel que pBlueScriptII (+) (pBSII). Dans un deuxième lieu, les différents fragments de l'endodomaine de BRI1 sont amplifiés par des réactions de polymérisation en chaîne sur le vecteur ayant pBSII : BRI1.

#### 3.8.1. Amplification et clonage du gène BRI1 dans pBlueScriptII (+)

L'amplification par PCR du fragment d'ADN codant pour le gène BRI1 a été effectuée sur de l'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana* en utilisant des amorces sens et anti-sens se situant sur les positions 5'UTR et 3'UTR respectivement. L'analyse bioinformatique du gène BRI1 démontre la présence de celui-ci dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* sur le chromosome 4. Le gène BRI1 ne présente aucun exon, d'où le choix de l'amplifier à partir de l'ADN génomique (Figure 22). Le fragment d'ADN amplifié par PCR est de 4000 pb tel que déterminé suite à l'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 23).

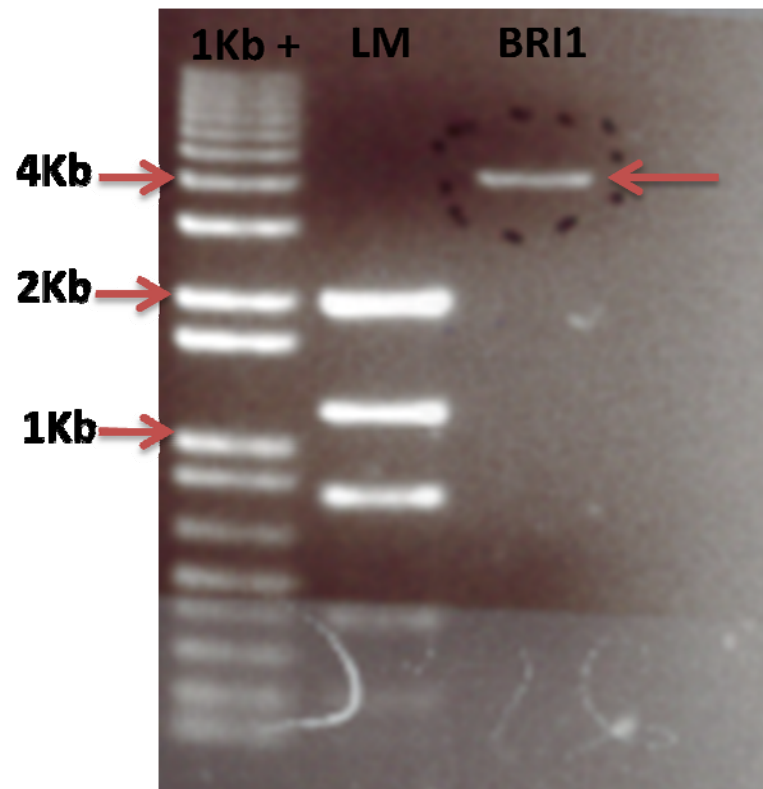
Le fragment d'ADN amplifié a été par la suite purifié et cloné dans le vecteur de clonage pBlueScriptII (+), préalablement digéré par l'enzyme de restriction EcoRI. Une réaction de clonage de type *blunt* (franche) a été effectuée afin de permettre le clonage de BRI1 dans pBlueScriptII (+). Le produit de ligation obtenu a été séquencé pour comparer la séquence en acides nucléiques du gène inséré à celle obtenue lors du repêchage du gène codant pour BRI1. Cette analyse a montré que le plasmide recombinant contenait une séquence en acides nucléiques identique à 100% à celle obtenue lors du repêchage et celle décrite sur *Gene Bank*. Ainsi, ce plasmide a été utilisé lors de l'amplification des différents

fragments de l'endodomaine de BRI1 permettant alors la construction des chimères SRK<sub>6</sub> : BRI.



**Figure 22 :** Schématisation du gène BRI1 sur le chromosome 4. A) Régions génomiques et transcrit. B) Contexte génomique





**Figure 23** : Amplification du gène BRI1 à partir de l'ADN génomique *d'Arabidopsis thaliana*

### **3.9. Construction des chimères SRK<sub>6</sub> : BRI 1 et SRK<sub>6</sub> : EGFR**

#### **3.9.1. Analyse bioinformatique et clonage des chimères**

##### **3.9.1.1 Analyse bioinformatique**

L'analyse bioinformatique des gènes choisis pour l'élaboration du bioessai a été effectuée afin de déterminer les stratégies de clonage ainsi que les domaines essentiels pour un bon fonctionnement des chimères. La revue de littérature sur les récepteurs de type kinase indique l'importance du domaine juxta membranaire dans le relais du signal. De ce fait, les gènes utilisés pour les fins du bioessai ont été étudiés pour déterminer ces régions. La prédiction des domaines juxta membranaires à l'aide de gratuitel tel que TMHH (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) nous permet de connaître les positions en acides aminés des régions encodant pour la structure transmembranaire. Dans le cas du récepteur SRK<sub>6</sub>, le domaine transmembranaire se situe entre les acides aminés 447 et 466 (Figure 24, A). Les domaines transmembranaires des récepteurs BRI1 et EGFR se situent entre les positions 792-814 et 646-668 respectivement (Figure 24, B). Le récepteur animal EGFR présente deux régions (646-668 et 773-795 aa) considérées comme étant des structures transmembranaires lors de l'analyse bioinformatique (Figure 24, C). Nous avons construit quatre chimères différentes pour chaque stratégie du bioessai - SRK<sub>6</sub>- BRI1 et SRK<sub>6</sub>-EGFR afin d'évaluer l'importance du domaine transmembranaire au niveau de l'induction du signal et afin d'identifier la chimère fonctionnelle suite à la liaison du ligand (SCR<sub>6</sub>/EGF) à l'ectodomaine SRK<sub>6</sub>.

### 3.9.2. Clonage des chimères

#### 3.9.2.1 Clonage des chimères SRK<sub>6</sub> : BRI1

La première construction correspond à la chimère ayant l'ectodomaine SRK<sub>6</sub> (1-433 aa) fusionné au domaine juxta membranaire extracellulaire (700-792 aa), transmembranaire (792-814 aa) et au domaine intracellulaire du récepteur BRI1 (814-1196 aa). Les autres constructions correspondent respectivement à l'ectodomaine SRK<sub>6</sub> (1-447; 1-467; 1-525 aa) fusionné aux positions (815; 793 et 700 aa) du récepteur BRI1 respectivement.

Dans un premier temps, le récepteur BRI1 a été amplifié à partir de l'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana* et cloné dans le vecteur pBlueScript II. La vérification de l'identité de l'insert par cartographie de restriction et par séquençage à l'aide d'amorces BRI1 spécifiques indique que le gène effectivement cloné dans pBlueScript II correspond à BRI1. Par la suite, l'amplification des différentes parties de BRI1 (700-1196; 793-1196; 815-1196; 883-1196) a été effectuée par PCR utilisant les amorces sens et antisens portant respectivement les sites de recombinaison Attb1 et Attb2 du système Gateway™. Les différents produits ainsi obtenus ont été clonés dans le vecteur d'entrée universel pZeo grâce à la BP clonase. La cartographie de restriction confirmative à l'aide des enzymes XhoI/PstI – double digestion – permet de libérer un fragment de 225pb. Ces enzymes de restriction coupent dans le domaine kinase du récepteur BRI1, ce qui confirme l'insertion des produits de PCR dans le vecteur pZeo.

Dans un deuxième temps, les différentes parties du récepteur BRI1 ont été clonées dans le vecteur de destination finale, pMDC83 (Curtis and Grossniklaus 2003), contenant le gène rapporteur codant pour la GFP. Le clonage a été effectué grâce à une réaction de recombinaison des séquences Attp1 et Attp2 médiée par la LR clonase. Deux plasmides recombinants, choisis par hasard pour chaque construction, ont été analysés grâce à une

cartographie de restriction (XhoI/PstI) et par séquençage. La digestion résulte en une libération d'un fragment de 225 pb. Par la suite, les différents fragments du récepteur SRK<sub>6</sub> ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques contenant le site de restriction HpaI en 5'. Les produits d'amplification ont été digérés avec l'enzyme HpaI afin de permettre leur clonage dans les vecteurs pMDC83 :BRI1 et d'ainsi obtenir les différentes constructions. Cette stratégie de clonage nous a permis de construire 3 des 4 constructions pour la chimère SRK<sub>6</sub>: BRI1. Le clonage de la chimère SRK<sub>6</sub> (433): BRI1<sub>(496)</sub> n'a pas fonctionné.

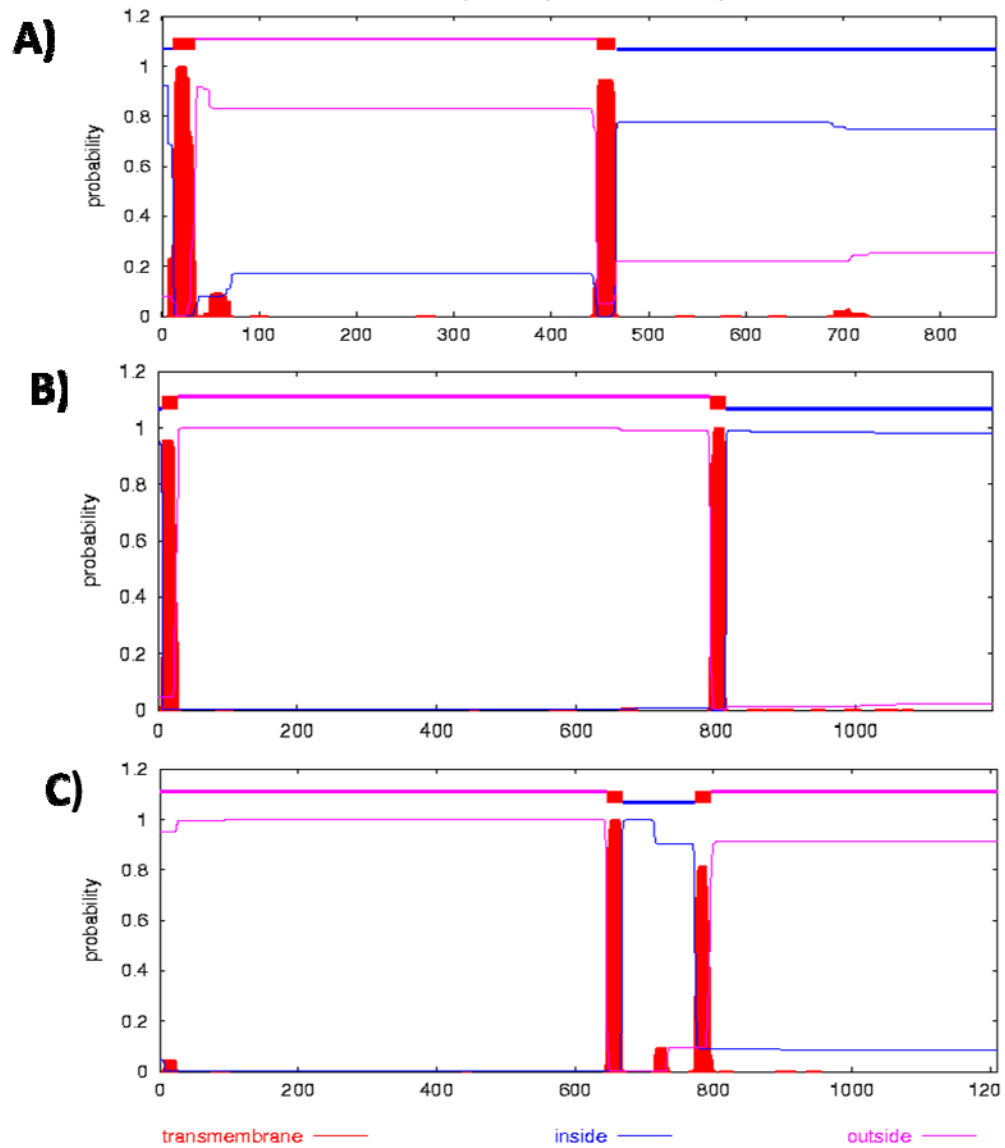
### **3.9.2.2. Clonage des chimères SRK<sub>6</sub> : hEGFR**

La première construction correspond à la chimère ayant l'ectodomaine SRK<sub>6</sub> (1-433 aa) fusionné à la construction pourvue de parties juxta membranaire extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire du récepteur animal EGFR (600-1210). Les autres constructions correspondent respectivement à l'ectodomaine SRK<sub>6</sub> (1-447; 1-467; 1-525 aa) fusionné aux positions (646, 696 et 707) du récepteur hEGFR respectivement.

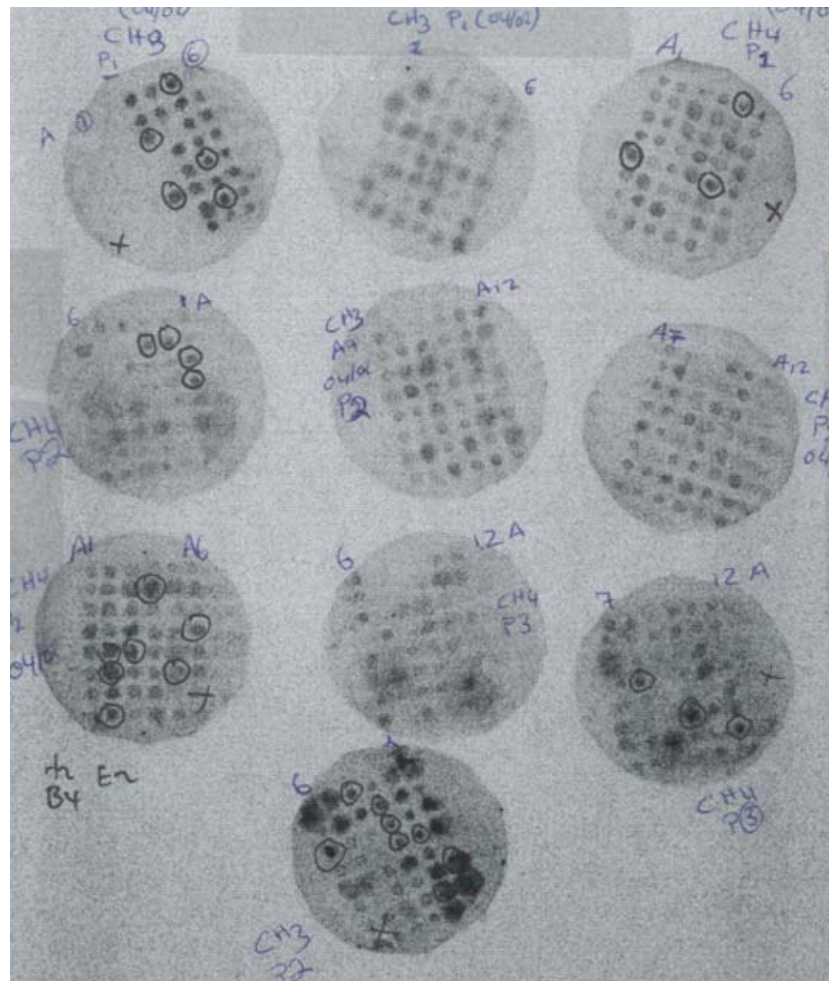
Dans un premier temps, les différentes parties du récepteur hEGFR ont été amplifiées par PCR à partir du plasmide pcDNA3 : EGFR fourni par Dr. Annie Anger (Université de Montréal) à l'aide d'amorces spécifiques pour chaque construction. Par la suite, les différents produits ainsi obtenus ont été clonés dans le vecteur d'entrée universel pZeo. La cartographie de restriction confirmative à l'aide des enzymes EcoRI permet de libérer trois fragments de 711pb, 768pb et 9000 pb respectivement.

Dans un deuxième temps, les différentes parties du récepteur hEGFR ont été clonées dans le vecteur de destination finale, pMDC32 (Curtis and Grossniklaus 2003). Le clonage a été opéré par le biais d'une réaction de recombinaison des séquences Attp1 et Attp2 médiée par la LR clonase. Deux plasmides recombinants, choisis par hasard pour chaque

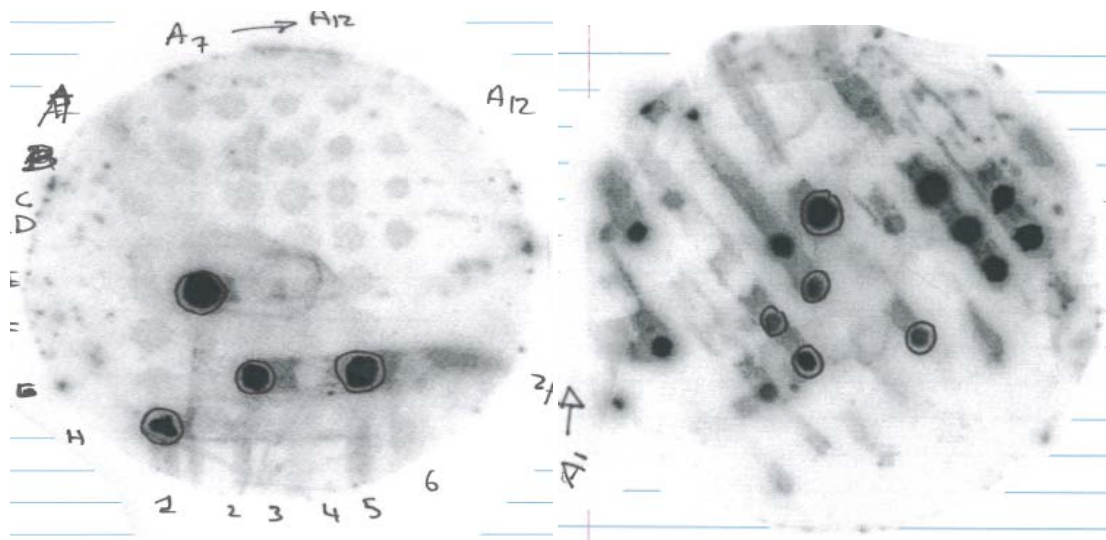
construction, ont été analysés par PCR diagnostique à l'aide des amorces EGFR fragments spécifiques. Par la suite, les différents fragments du récepteur SRK<sub>6</sub> ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques contenant le site de restriction HpaI en 5'. Les produits d'amplification ont été digérés avec l'enzyme HpaI afin de permettre leur clonage dans les vecteurs pMDC32 : EGFR et d'ainsi obtenir les différentes constructions. Cette stratégie de clonage nous a permis de construire 2 des 4 constructions pour la chimère SRK<sub>6</sub> : EGFR. Le clonage des chimères SRK<sub>6 (433)</sub> : EGFR<sub>(707)</sub> et SRK<sub>6 (447)</sub> : EGFR<sub>(696)</sub> n'a pas fonctionné.



**Figure 24 :** Prédiction des régions transmembranaires des récepteurs SRK<sub>6</sub>, BRI1 et EGFR respectivement en utilisant le gratuitel TMHMM. A) SRK<sub>6</sub>. B) BRI1. C) EGFR



**Figure 25 :** Screening par hybridation sur membrane de PVDF des différentes chimères SRK<sub>6</sub>:BRI1

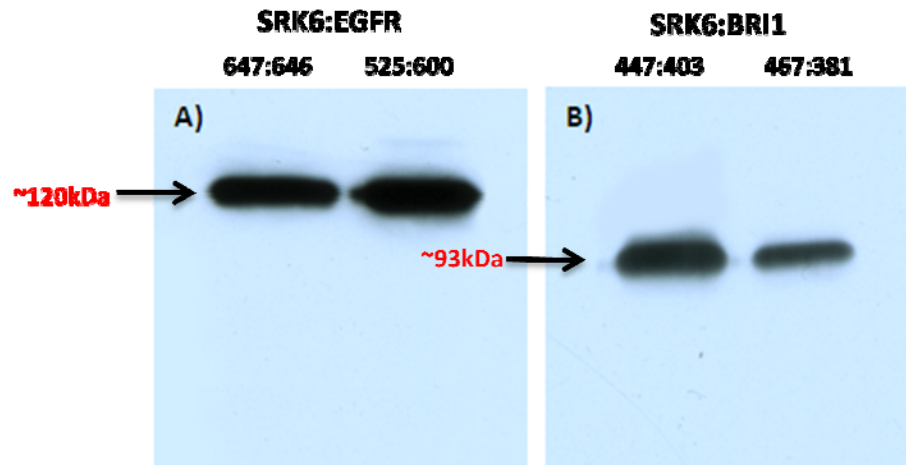


**Figure 26 :** Screening par hybridation sur membrane de PVDF des différentes chimères SRK<sub>6</sub>: EGFR



### 3.10. Expression des chimères

Les constructions codant pour les chimères clonées ont été agro-infiltrées dans un système d'expression de *Nicotiana benthamiana*. Deux jours suivant la transfection, les protéines ont été extraites, dénaturées et migrées sur un gel SDS-PAGE. Le transfert des protéines sur membrane de PVDF pour l'analyse par immunobuvardage de type western a été effectué. Les chimères, et dépendamment des domaines SRK<sub>6</sub>:BRI1 ou SRK<sub>6</sub>:EGFR, présentent des tailles calculées différentes. Par exemple, la chimère SRK<sub>6</sub>:EGFR (467 : 646) présente une taille d'à peu près 122 kDa, tandis que la chimère SRK<sub>6</sub>:BRI1 (467 : 381) équivaut à 93 kDa. Ce calcul est basé sur la masse moyenne d'un acide aminé qui équivaut à peu près à 0.11 Kda. La détection de bandes correspondantes aux tailles calculées indique que les bandes correspondent bel et bien aux chimères exprimées (Figure 27).



**Figure 27 :** Immunobuvardage de type western des différentes chimères SRK<sub>6</sub> : EGFR et SRK<sub>6</sub> : BRI1 exprimées dans le système *Nicotiana benthamiana*. A) SRK<sub>6</sub> : EGFR (647 :646 et 525 :600 respectivement). B) SRK<sub>6</sub> : BRI1 (447 :403 et 467 : 381 respectivement)

## 4. Discussion

Le séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* a permis une avancée importante dans la prédiction et la découverte de séquences pouvant coder des gènes inconnus jusqu'à présent. Parmi ces gènes identifiés par des analyses bioinformatiques, on retrouve plus de 200 récepteurs de type sérine thréonine kinase. Les techniques biochimiques et génétiques conventionnelles ont permis la découverte d'à peu près 6 paires ligand/récepteur. L'incapacité des techniques conventionnelles à caractériser le reste des ligands inconnus jusqu'à présent nécessite le développement de nouveaux procédés pouvant répondre à cette problématique.

La liaison ligand-récepteur représente une interaction moléculaire très spécifique, cette dernière étant dictée par une complémentarité de structure tridimensionnelle entre le site de liaison sur le récepteur et un épitope du ligand. Cette complémentarité de structure est elle-même le résultat des interactions thermodynamiques complexes telles que des interactions électrostatiques, hydrogènes et des forces Van der Waal.

De ce fait, plusieurs techniques se basant sur le concept de l'interaction spécifique entre un récepteur et son ligand ont été développées. Parmi ces techniques, on retrouve l'ELISA, le Western blot, l'immunoprécipitation et la résonance de plasmon de surface. L'utilisation de cette propriété des récepteurs pour répondre à la problématique des couples récepteurs-ligands orphelins, prédits suite au séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana*, s'avère un potentiel énorme pour le développement d'un bioessai. L'objectif de ce mémoire est de mettre au point un système de détection des ligands inconnus, basé sur la reconnaissance spécifique d'un ligand par un récepteur spécifique.

## 4.1. Production, purification et activité des protéines SCR

### 4.1.1. Production et purification des protéines SCR

L'auto-incompatibilité sporophytique chez les *Brassicaceae* est régulée par une interaction moléculaire très spécifique entre un récepteur de type sérine thréonine kinase et son ligand SCR (Stein, Dixit et al. 1996; Schopfer, Nasrallah et al. 1999; Shiba, Takayama et al. 2001; Fobis-Loisy, Miege et al. 2004). Le ligand SCR est une protéine riche en cystéine et présente un poids moléculaire apparent variant entre 8 et 10 KDa (Kachroo, Schopfer et al. 2001) exprimé sur la surface du pollen (Shiba, Takayama et al. 2001). Ces protéines diffèrent des *pollens coat proteins* (PCP) par leur patron de résidu cystéine. Les PCP ont été longtemps considérés les meilleurs candidats à remplir le rôle du déterminant mâle de l'auto-incompatibilité (Stanchev, Doughty et al. 1996; Doughty, Dixon et al. 1998). Contrairement aux protéines SCR, les PCP ne présentent ni une liaison génétique ni un polymorphisme associé au locus *S*.

Il a été démontré par les études de Kachroo et al. que l'interaction entre le ligand SCR et son récepteur est responsable de la réaction d'incompatibilité chez les *Brassicaceae* excluant ainsi le rôle des PCP comme déterminants mâles. Ces mêmes auteurs ont démontré une interaction directe et allèle spécifique entre le ligand SCR et le domaine extracellulaire SRK (Kachroo, Schopfer et al. 2001) par ELISA. Dans leur étude, Schopfer et al. ont démontré que le pollen des plantes  $S_2S_2/SCR_6^+$  active l'auto-incompatibilité et résulte en un rejet du pollen par les plantes ayant un haplotype  $S_6S_6$ . Leurs expériences avancent que la protéine  $SCR_6$  joue un rôle de déterminant mâle de l'auto-incompatibilité.

De plus, le gène codant pour SCR présente un patron d'expression anthère spécifique, et ceci, après génération de microspores haploïdes (Schopfer, Nasrallah et al. 1999). Ajoutons à cela que la corrélation positive entre la perte de spécificité du pollen

S<sub>13</sub>S<sub>13</sub> et l'absence de transcrit SCR<sub>13</sub> chez le mutant *m1600* - mutant S<sub>13</sub>S<sub>13</sub> généré par irradiation  $\gamma$ - fournit des évidences supplémentaires quant au rôle de SCR comme déterminant mâle de l'auto-incompatibilité.

Les protéines ainsi obtenues après induction et purification ont un poids apparent similaire à celui décrit dans la littérature (Kachroo, Schopfer et al. 2001). Par contre, les protéines obtenues dans notre laboratoire ne présentent pas un patron de migration en doublet, tel que décrit par Kachroo et al. (Kachroo, Schopfer et al. 2001). Ceci peut être expliqué par un meilleur clivage au niveau du périplasme bactérien dans les conditions décrites dans ce mémoire. La plus grande partie des protéines produites dans le système procaryotique utilisé se présente dans la fraction insoluble (corps d'inclusion). Ceci est probablement dû à une surexpression de la production ou à une incapacité des bactéries à assurer un repliement correct des protéines SCR.

#### **4.1.2. Bioactivité des protéines SCR**

La mise au point de la preuve de concept du bioessai requiert avant tout un couple ligand-récepteur bien caractérisé pour démontrer la liaison du ligand à son récepteur et la transduction du signal. Ce dernier est un élément très important dans le design du bioessai puisque le relai du signal, suite à la liaison du ligand avec le domaine extracellulaire spécifique, est requis pour détecter une interaction ligand-récepteur par un gène rapporteur. Ainsi, l'activité des protéines SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub> produites dans un système procaryotique a été évaluée par des tests de pollinisation. Le traitement de stigmas issus de plantes ayant un haplotype S<sub>6</sub>S<sub>6</sub> avec les protéines recombinantes SCR<sub>6</sub> active l'auto-incompatibilité aboutissant à une inhibition du pollen compatible S<sub>13</sub>S<sub>13</sub> (Figure 15, Tableau6). Des résultats similaires ont été obtenus lors du traitement des stigmas S<sub>13</sub>S<sub>13</sub> avec les protéines recombinantes SRC<sub>13</sub> (Figure 15, Tableau 6). Ces résultats concordent parfaitement avec

ceux obtenus par Kachroo et al. où ces auteurs démontrent que les protéines SCR recombinantes activent l'auto-incompatibilité au niveau des stigmas exprimant le même haplotype. La démonstration de l'activité des protéines recombinantes SCR<sub>6</sub> et SCR<sub>13</sub> est importante pour le bioessai en développement. Ces protéines vont être utilisées ultérieurement lors de tests d'activité de constructions chimériques à l'étude. La liaison des protéines SCR<sub>6</sub> à la chimère SRK<sub>6</sub>:BRI1 ou à la chimère SRK<sub>6</sub>:EGFR devrait induire soit une transduction du signal vers le rapporteur GUS, soit la phosphorylation du domaine intracellulaire EGFR. Tout échec à induire une réponse devrait être dû à un problème au niveau de la chimère et non au niveau de l'activité des protéines SCR.

## **4.2. Gènes surexprimés par la voie des brassinolides et construction des promoteurs : rapporteurs**

L'activation de la chimère SRK<sub>6</sub>:BRI1 devrait induire une cascade de signalisation aboutissant à la modulation des gènes régis par la voie des brassinostéroïdes, cette cascade étant elle-même régie par le domaine kinase du récepteur BRI1, fusionné à l'ectodomaine SRK. Afin de déterminer les gènes répondant aux brassinostéroïdes, plusieurs études de régulation génique ont été performed (Zurek, Rayle et al. 1994; Hu, Bao et al. 2000; Goda, Shimada et al. 2002; Mussig, Fischer et al. 2002). Les données de Goda et al. démontrent que 59 gènes sont surexprimés par cette voie tandis que 36 gènes présentent une sous expression lors du traitement aux brassinolides. Parmi les gènes les plus induits par la voie des brassinolides, on retrouve ceux impliqués dans l'élongation tels que Xyloglucan endotransglycosylase TCH4 (Xu, Purugganan et al. 1995), AtExp8 (Gray-Mitsumune, Mellerowicz et al. 2004) et KCS1 (Blacklock and Jaworski 2006). De plus, certains membres de la famille des facteurs de transcription répondant à l'auxine (Aux/IAA) sont surexprimés par la voie des brassinolides tels que IAA3, IAA5 et IAA19 (Goda, Shimada et al. 2002).

L'augmentation des gènes IAA3, IAA5 et IAA19 est peut-être due à des taux altérés d'auxine au niveau de plantules. Ce raisonnement est appuyé par des études antérieures démontrant une augmentation de l'acide acétique-3-indole (IAA) au niveau d'hypocotyles traitées aux BL (Eun, 1989). Malgré cela, l'induction des gènes IAA3 et IAA19 une heure post traitement pointe vers un mécanisme différent que celui des taux d'auxine altérés. Toutefois, et d'après Müssig et al., le gène TCH4 ne présente pas un taux de transcrit significativement altéré chez les plantes BR déficientes. De ce fait, et selon les critères de haute stringence établis lors des études de Müssig et al., ce gène ne peut être considéré comme cible primaire des brassinostéroïdes. Contrairement à Goda et al., les études de Müssig et al., indiquent que 54 gènes sont surexprimés, suite à l'induction aux BL, dont 9 seulement sont considérés comme cible primaire. Les différences au niveau du facteur d'expression, du nombre de gènes et des gènes en commun entre ces deux études sont dues aux divergences au niveau des critères de stringence, du design de l'étude et des conditions expérimentales. Parmi les cinq gènes choisis et surexprimés d'après Goda et al., deux se recoupent entre les deux études (Tableau 7). Les études par qPCR ont démontré la surexpression des gènes choisis une heure post traitement. Les résultats obtenus par qPCR démontrent une surexpression élevée des gènes TCH4, *auxin inducible gene* et XTR6. Les promoteurs de ces gènes ont été fusionnés au rapporteur GUS afin de générer les constructions rapporteuses.

Ces constructions ont démontré un patron d'expression similaire aux études de qPCR au niveau des plantes *Nicotiana benthamiana* transformées par les constructions et induites aux BL. La construction TCH4 démontre le taux d'expression le plus élevé parmi celles testées avec ce système. Dans la littérature, une surexpression du gène TCH4 face à différents stress tels que la concentration extracellulaire en calcium, la chaleur, le froid et la noirceur (Braam and Davis 1990; Braam 1992; Polisensky and Braam 1996) a été prouvé. Conséquemment, l'utilisation du promoteur de ce gène présente un risque de faux positif

élevé. Par contre, l'utilisation de contrôle négatif – non traité – pourrait contourner ce problème.

### 4.3. Construction des chimères et expression

La construction des deux chimères SRK<sub>6</sub>:BRI1 et SRK<sub>6</sub>:EGFR fonctionnelles nécessite une fusion entre trois récepteurs – SRK<sub>6</sub>, BRI1 et EGFR – hautement étudiés et caractérisés dans la littérature. L'activité de ces chimères dépend directement du choix des domaines fonctionnels – le domaine extracellulaire, le domaine juxta membranaire extra/intracellulaire, le domaine transmembranaire et le domaine kinase – de ces récepteurs pris un à la fois. En concevant les chimères pour le bioessai en développement, nous avons pris en considération l'importance de chaque domaine. Conséquemment, nous avons construit quatre combinaisons pour chaque chimère. Ces combinaisons prennent en considération l'importance de chaque domaine. Par exemple, le domaine JM du récepteur Xa21 a été prouvé essentiel au bon fonctionnement de la chimère BRI1 : Xa21. Dans le cas du récepteur BRI1, le domaine juxta membranaire est phosphorylé (Oh, Ray et al. 2000).

Lors de sa phosphorylation, le domaine JM agit comme site d'ancrage pour certaines phosphotyrosines ayant un rôle important dans le relais de la cascade de signalisation (Holland, Gale et al. 1997; Kuriyan and Cowburn 1997). Par contre, des études de délétion du domaine JM de BRI1 ont démontré que celui-ci n'est essentiel ni à l'activité kinase ni à sa localisation au niveau de la membrane (Wang, Li et al. 2005). En revanche, le domaine JM de BRI1 est requis pour le maintien de la fonctionnalité du récepteur puisque la délétion résulte en un récepteur non fonctionnel. Il a été suggéré que son rôle serait de recruter des substrats de BRI1 et d'augmenter l'activité kinase (Wang, Li et al. 2005). Aussi les combinaisons de chimères avec ou sans le domaine JM des deux récepteurs BRI1 et EGFR ont été fusionnées au domaine extracellulaire de SRK<sub>6</sub>. Lors du



design des constructions, nous avons toujours pris en considération le domaine PAN\_APPLE du récepteur SRK<sub>6</sub>. Ce domaine en position 347- 443 aa est responsable de la dimérisation ligand-indépendante du récepteur *in vivo* (Naithani, Chookajorn et al. 2007). Ce même domaine contient une région hypervariable entre les acides aminés 410 et 420 et aurait une implication importante dans la dimérisation homo ou hétérotypique du récepteur (Naithani, Chookajorn et al. 2007). Ainsi, les chimères ayant été clonées dans les vecteurs d'expression Gateway (Curtis and Grossniklaus 2003), ont été infiltrées dans *Nicotiana benthamiana* et leur expression évaluée par immunobuvardage de type western. Nos résultats indiquent que deux des trois chimères pour chaque construction – SRK<sub>6</sub> : BRI1 et SRK<sub>6</sub> : EGFR – ont été exprimées dans les plantes.

## 5. Perspective d'avenir

Pour mettre au point le bioessai, il nous faut d'abord justifier sa faisabilité par la démonstration du concept. Afin de démontrer ce dernier, des plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* ayant un génotype SRK<sub>6</sub> : BRI1 et promoteur : GUS devraient être générées. Pour la seconde stratégie du bioessai décrite dans ce mémoire, des plantes transgéniques ayant la construction SRK<sub>6</sub> : EGFR devraient être également générées. Ces plantes transgéniques peuvent être produites en utilisant l'agro-infiltration, une technique bien établie dans la littérature et dont nous avons une expérience accrue dans notre laboratoire. Une fois les plantes transgéniques sélectionnées, ces dernières devraient être testées par RT-PCR pour déterminer leur génotype et par immunobuvardage de type western afin de démontrer l'expression des chimères. L'utilisation de cette technique est laborieuse et requiert un travail de 3 à 6 mois.

Une fois les plantes transgéniques établies, les protoplastes devraient être extraits et les cellules mises en présence de protéines SCR purifiées. Tel que discuté dans ce mémoire, la majeure partie des protéines recombinantes produites se retrouve dans les corps d'inclusion sous forme insoluble. Il serait important de procéder à des techniques de solubilisation et de renaturation de ces protéines et de déterminer les conditions nécessaires, telles que décrite dans la littérature (Singh and Panda 2005), afin de rétablir l'activité de ces protéines. La purification des protéines SCR devrait être de haute qualité; nous recommandons donc l'utilisation du système de purification AKTA®, un système basé sur la chromatographie de type FPLC et qui est accessible à l'institut de recherche en biologie végétale. Le choix de l'éluant devrait être considéré puisque celui-ci peut interférer avec la viabilité des protoplastes.

Une façon de contourner l'effet de l'éluant serait d'appliquer une dialyse contre un tampon physiologique. L'ajout des protéines SCR sur les protoplastes dans une plaque 96 puits pendant une heure devrait – et dépendamment de la chimère à l'étude – soit induire le rapporteur GUS, soit provoquer la dimérisation et la phosphorylation du domaine kinase de la construction SRK<sub>6</sub> : EGFR. La détection d'une coloration bleue ou d'une fluorescence – selon les méthodes de lectures utilisées – devrait être performée directement dans une plaque 96 puits dans le cas des chimères SRK<sub>6</sub> :BRI1. Dans le cas de la chimère SRK<sub>6</sub> : BRI1, une lyse cellulaire et une détection par immunobuvardage de type western du domaine kinase EGFR phosphorylé devraient être performées. Une alternative à l'immunobuvardage de type western serait l'utilisation d'une plaque ELISA spécifique contre EGFR phosphorylé. Quoique les deux techniques – immunobuvardage de type western et l'ELISA – sont très spécifiques quand à la détection d'antigènes, leurs sensibilités diffèrent dépendamment de l'antigène à l'étude (Sherwood, Williams et al. 1986; Karlsson, Mollegard et al. 1989). Toutefois, l'ELISA serait plus efficace surtout dans un contexte de détection automatisée et à haut débit (*high throughput*).

Une alternative à la production de plantes transgéniques serait l'utilisation d'un système d'expression transitoire dans une culture cellulaire en suspension tel que les protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* (Sheen 2001). La mise au point de ce système requiert une optimisation des conditions de libération des protoplastes, la mise au point de la transfection – choix de la technique de transfection et la concentration de l'ADN – et l'optimisation des temps d'expression et d'induction aux SCR (Sheen 2001).

Tel que discuté dans ce mémoire, les gènes surexprimés par la voie des brassinolides sont aussi régulés par le stress – TCH4 – ou par d'autres hormones – *Auxin related protein* – comme l'auxine. De ce fait, il serait préférable de tester les 5 gènes et d'établir une procédure normale standardisée (PNS) afin de minimiser le stress. Par exemple, le gène TCH4 est surexprimé par le froid, la chaleur, la noirceur et le Ca<sup>2++</sup>

extracellulaire (Braam and Davis 1990; Braam 1992; Polisensky and Braam 1996). La PNS, dans ce cas, devrait prendre en considération la composition du milieu de croissance des cellules ainsi que les températures et le niveau de luminosité. Il serait aussi intéressant d'essayer d'autres gènes régulés par la voie des brassinolides.

Quelles que soient les méthodes utilisées pour démontrer la faisabilité du concept, des chimères récepteurs orphelins (éctoRo): BRI1 (éctoRo : BRI1 domaine kinase) ou éctoRo : EGFR devraient être construites et testées avec différentes fractions protéiques. Suite à une détection du signal, la fraction protéique contenant le ligand potentiel serait soumise à un effet *bottleneck* par purification – exclusion stérique, hydrophobicité, etc. – afin de réduire les contaminants et de pêcher le bon ligand.

## Bibliographie

- Aruffo, A. and B. Seed (1987). "Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(23): 8573-7.
- Becraft, P. W. (2002). "Receptor kinase signaling in plant development." Annu Rev Cell Dev Biol **18**: 163-92.
- Becraft, P. W., P. S. Stinard, et al. (1996). "CRINKLY4: A TNFR-like receptor kinase involved in maize epidermal differentiation." Science **273**(5280): 1406-9.
- Blacklock, B. J. and J. G. Jaworski (2006). "Substrate specificity of Arabidopsis 3-ketoacyl-CoA synthases." Biochem Biophys Res Commun **346**(2): 583-90.
- Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling." Nature **411**(6835): 355-65.
- Boeke, J. D. and P. Model (1982). "A prokaryotic membrane anchor sequence: carboxyl terminus of bacteriophage fl gene III protein retains it in the membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(17): 5200-4.
- Bower, M. S., D. D. Matias, et al. (1996). "Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a Brassica S locus receptor kinase." Plant Cell **8**(9): 1641-50.
- Braam, J. (1992). "Regulated expression of the calmodulin-related TCH genes in cultured Arabidopsis cells: induction by calcium and heat shock." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(8): 3213-6.
- Braam, J. and R. W. Davis (1990). "Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in Arabidopsis." Cell **60**(3): 357-64.
- Cabrillac, D., J. M. Cock, et al. (2001). "The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins." Nature **410**(6825): 220-3.
- Carpita, N. C. and D. M. Gibeaut (1993). "Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth." Plant J **3**(1): 1-30.

- Catimel, B., M. Nerrie, et al. (1997). "Kinetic analysis of the interaction between the monoclonal antibody A33 and its colonic epithelial antigen by the use of an optical biosensor. A comparison of immobilisation strategies." J Chromatogr A **776**(1): 15-30.
- Chan, F. K. (2000). "The pre-ligand binding assembly domain: a potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function." Ann Rheum Dis **59 Suppl 1**: i50-3.
- Chan, F. K., H. J. Chun, et al. (2000). "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling." Science **288**(5475): 2351-4.
- Chiang, M. K. and J. G. Flanagan (1995). "Interactions between the Flk-1 receptor, vascular endothelial growth factor, and cell surface proteoglycan identified with a soluble receptor reagent." Growth Factors **12**(1): 1-10.
- Clark, S. E., M. P. Running, et al. (1993). "CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis." Development **119**(2): 397-418.
- Clouse, S. D. (1996). "Plant hormones: brassinosteroids in the spotlight." Curr Biol **6**(6): 658-61.
- Clouse, S. D., M. Langford, et al. (1996). "A brassinosteroid-insensitive mutant in Arabidopsis thaliana exhibits multiple defects in growth and development." Plant Physiol **111**(3): 671-8.
- Cosman, D. (1994). "A family of ligands for the TNF receptor superfamily." Stem Cells **12**(5): 440-55.
- Curtis, M. D. and U. Grossniklaus (2003). "A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta." Plant Physiol **133**(2): 462-9.
- DeFea, K. A., J. Zalevsky, et al. (2000). "beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2." J Cell Biol **148**(6): 1267-81.
- Delorme, V., J. L. Giranton, et al. (1995). "Characterization of the S locus genes, SLG and SRK, of the Brassica S3 haplotype: identification of a membrane-localized protein encoded by the S locus receptor kinase gene." Plant J **7**(3): 429-40.
- Dievart, A. and S. E. Clark (2003). "Using mutant alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinases." Curr Opin Plant Biol **6**(5): 507-16.
- Dievart, A. and S. E. Clark (2004). "LRR-containing receptors regulating plant development and defense." Development **131**(2): 251-61.

- Dixit, R., M. E. Nasrallah, et al. (2000). "Post-transcriptional maturation of the S receptor kinase of Brassica correlates with co-expression of the S-locus glycoprotein in the stigmas of two Brassica strains and in transgenic tobacco plants." Plant Physiol **124**(1): 297-311.
- Doughty, J., S. Dixon, et al. (1998). "PCP-A1, a defensin-like Brassica pollen coat protein that binds the S locus glycoprotein, is the product of gametophytic gene expression." Plant Cell **10**(8): 1333-47.
- Dunne, A. and L. A. O'Neill (2003). "The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense." Sci STKE **2003**(171): re3.
- Ehsan, H., W. K. Ray, et al. (2005). "Interaction of Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 receptor kinase with a homolog of mammalian TGF-beta receptor interacting protein." Plant J **43**(2): 251-61.
- Fahnert, B., H. Lilie, et al. (2004). "Inclusion bodies: formation and utilisation." Adv Biochem Eng Biotechnol **89**: 93-142.
- Ferguson, K. M., M. B. Berger, et al. (2003). "EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization." Mol Cell **11**(2): 507-17.
- Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature **340**(6230): 245-6.
- Flanagan, J. G. and P. Leder (1990). "The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts." Cell **63**(1): 185-94.
- Fobis-Loisy, I., C. Miede, et al. (2004). "Molecular evolution of the s locus controlling mating in the brassicaceae." Plant Biol (Stuttg) **6**(2): 109-18.
- Fournier, A. E., T. GrandPre, et al. (2001). "Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration." Nature **409**(6818): 341-6.
- Friedrichsen, D. M., C. A. Joazeiro, et al. (2000). "Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase." Plant Physiol **123**(4): 1247-56.
- Geldner, N., D. L. Hyman, et al. (2007). "Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1." Genes Dev **21**(13): 1598-602.
- Glavin, T. L., D. R. Goring, et al. (1994). "Features of the extracellular domain of the S-locus receptor kinase from Brassica." Mol Gen Genet **244**(6): 630-7.
- Goda, H., Y. Shimada, et al. (2002). "Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis." Plant Physiol **130**(3): 1319-34.

- Gomez-Gomez, L., Z. Bauer, et al. (2001). "Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in Arabidopsis." Plant Cell **13**(5): 1155-63.
- Gomez-Gomez, L. and T. Boller (2000). "FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis." Mol Cell **5**(6): 1003-11.
- Goring, D. R. and S. J. Rothstein (1992). "The S-locus receptor kinase gene in a self-incompatible Brassica napus line encodes a functional serine/threonine kinase." Plant Cell **4**(10): 1273-81.
- Gray-Mitsumune, M., E. J. Mellerowicz, et al. (2004). "Expansins abundant in secondary xylem belong to subgroup A of the alpha-expansin gene family." Plant Physiol **135**(3): 1552-64.
- Haffani, Y. Z., T. Gaude, et al. (2004). "Antisense suppression of thioredoxin h mRNA in Brassica napus cv. Westar pistils causes a low level constitutive pollen rejection response." Plant Mol Biol **55**(5): 619-30.
- Hartley, D. L. and J. F. Kane (1988). "Properties of inclusion bodies from recombinant Escherichia coli." Biochem Soc Trans **16**(2): 101-2.
- He, Z., Z. Y. Wang, et al. (2000). "Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1." Science **288**(5475): 2360-3.
- He, Z. H., I. Cheeseman, et al. (1999). "A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, Wak1-5, are expressed in specific organs of Arabidopsis." Plant Mol Biol **39**(6): 1189-96.
- Hecht, V., J. P. Vielle-Calzada, et al. (2001). "The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture." Plant Physiol **127**(3): 803-16.
- Hengen, P. N. (1997). "False positives from the yeast two-hybrid system." Trends Biochem Sci **22**(1): 33-4.
- Hinata, K. (1983). Gene analysis of selfcompatibility in Brassica campestris var. yellow sarson. Proceedings of the 6th International Rapeseed Conference.
- Holland, S. J., N. W. Gale, et al. (1997). "Juxtamembrane tyrosine residues couple the Eph family receptor EphB2/Nuk to specific SH2 domain proteins in neuronal cells." Embo J **16**(13): 3877-88.



- Honegger, A., T. J. Dull, et al. (1988). "Biological activities of EGF-receptor mutants with individually altered autophosphorylation sites." EMBO J **7**(10): 3045-52.
- Honegger, A., T. J. Dull, et al. (1988). "Kinetic parameters of the protein tyrosine kinase activity of EGF-receptor mutants with individually altered autophosphorylation sites." EMBO J **7**(10): 3053-60.
- Hu, Y., F. Bao, et al. (2000). "Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in Arabidopsis." Plant J **24**(5): 693-701.
- Hubbard, S. R. (1999). "Src autoinhibition: let us count the ways." Nat Struct Biol **6**(8): 711-4.
- Hubbard, S. R. (1999). "Structural analysis of receptor tyrosine kinases." Prog Biophys Mol Biol **71**(3-4): 343-58.
- Hubbard, S. R. and J. H. Till (2000). "Protein tyrosine kinase structure and function." Annu Rev Biochem **69**: 373-98.
- Ivanov, R. and T. Gaude (2009). "Endocytosis and Endosomal Regulation of the S-Receptor Kinase during the Self-Incompatibility Response in Brassica oleracea." Plant Cell.
- Jin, H., Z. Yan, et al. (2007). "Allele-specific suppression of a defective brassinosteroid receptor reveals a physiological role of UGGT in ER quality control." Mol Cell **26**(6): 821-30.
- Kachroo, A., C. R. Schopfer, et al. (2001). "Allele-specific receptor-ligand interactions in Brassica self-incompatibility." Science **293**(5536): 1824-6.
- Kakita, M., K. Murase, et al. (2007). "Two distinct forms of M-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with S-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in Brassica rapa." Plant Cell **19**(12): 3961-73.
- Kandasamy, M. K., D. J. Paolillo, et al. (1989). "The S-locus specific glycoproteins of Brassica accumulate in the cell wall of developing stigma papillae." Dev Biol **134**(2): 462-72.
- Karlsson, M., I. Mollegard, et al. (1989). "Comparison of Western blot and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Lyme borreliosis." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **8**(10): 871-7.
- Kinoshita, T., A. Cano-Delgado, et al. (2005). "Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1." Nature **433**(7022): 167-71.

- Kobe, B. and J. Deisenhofer (1994). "The leucine-rich repeat: a versatile binding motif." Trends Biochem Sci **19**(10): 415-21.
- Kuriyan, J. and D. Cowburn (1997). "Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling." Annu Rev Biophys Biomol Struct **26**: 259-88.
- Kurten, R. C., D. L. Cadena, et al. (1996). "Enhanced degradation of EGF receptors by a sorting nexin, SNX1." Science **272**(5264): 1008-10.
- Li, J. and J. Chory (1998). "Brassinosteroid actions in plants." Journal of Experimental Botany **50**(332): 275-282.
- Loeb, D. M., R. M. Stephens, et al. (1994). "A Trk nerve growth factor (NGF) receptor point mutation affecting interaction with phospholipase C-gamma 1 abolishes NGF-promoted peripherin induction but not neurite outgrowth." J Biol Chem **269**(12): 8901-10.
- Luan, S. (2002). "Tyrosine phosphorylation in plant cell signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11567-9.
- Malmqvist, M. (1993). "Biospecific interaction analysis using biosensor technology." Nature **361**(6408): 186-7.
- Malmqvist, M. (1993). "Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics." Curr Opin Immunol **5**(2): 282-6.
- Manning, C. B., A. B. Cummins, et al. (2002). "A mutant epidermal growth factor receptor targeted to lung epithelium inhibits asbestos-induced proliferation and proto-oncogene expression." Cancer Res **62**(15): 4169-75.
- Martin-Nieto, J. and A. Villalobo (1998). "The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site." Biochemistry **37**(1): 227-36.
- McConnell, H. M., J. C. Owicki, et al. (1992). "The cytosensor microphysiometer: biological applications of silicon technology." Science **257**(5078): 1906-12.
- Miyada, C. G., L. Stoltzfus, et al. (1984). "Regulation of the araC gene of Escherichia coli: catabolite repression, autoregulation, and effect on araBAD expression." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(13): 4120-4.
- Mora-Garcia, S., G. Vert, et al. (2004). "Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in Arabidopsis." Genes Dev **18**(4): 448-60.
- Mu, J. H., H. S. Lee, et al. (1994). "Characterization of a pollen-expressed receptor-like kinase gene of Petunia inflata and the activity of its encoded kinase." Plant Cell **6**(5): 709-21.

- Murase, K., H. Shiba, et al. (2004). "A membrane-anchored protein kinase involved in Brassica self-incompatibility signaling." Science **303**(5663): 1516-9.
- Mussig, C., S. Fischer, et al. (2002). "Brassinosteroid-regulated gene expression." Plant Physiol **129**(3): 1241-51.
- Naithani, S., T. Chookajorn, et al. (2007). "Structural modules for receptor dimerization in the S-locus receptor kinase extracellular domain." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(29): 12211-6.
- Nam, K. H. and J. Li (2002). "BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling." Cell **110**(2): 203-12.
- Nam, K. H. and J. Li (2004). "The Arabidopsis transthyretin-like protein is a potential substrate of BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1." Plant Cell **16**(9): 2406-17.
- Nasrallah, J. B. (2002). "Recognition and rejection of self in plant reproduction." Science **296**(5566): 305-8.
- Nice, E. C. and B. Catimel (1999). "Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions." Bioessays **21**(4): 339-52.
- Nice, E. C., B. Catimel, et al. (1997). "Strategies for the identification and purification of ligands for orphan biomolecules." Letters in Peptide Science(4): 107-120.
- Nuhse, T. S., A. Stensballe, et al. (2004). "Phosphoproteomics of the Arabidopsis plasma membrane and a new phosphorylation site database." Plant Cell **16**(9): 2394-405.
- O'Connor, E., B. Eisenhaber, et al. (2005). "Species specific membrane anchoring of nycalopin, a small leucine-rich repeat protein." Hum Mol Genet **14**(13): 1877-87.
- Obermeier, A., H. Halfter, et al. (1993). "Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction." Embo J **12**(3): 933-41.
- Obermeier, A., R. Lammers, et al. (1993). "Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex." J Biol Chem **268**(31): 22963-6.
- Oh, M. H., W. K. Ray, et al. (2000). "Recombinant brassinosteroid insensitive 1 receptor-like kinase autophosphorylates on serine and threonine residues and phosphorylates a conserved peptide motif in vitro." Plant Physiol **124**(2): 751-66.
- Panopoulou, E., D. J. Gillooly, et al. (2002). "Early endosomal regulation of Smad-dependent signaling in endothelial cells." J Biol Chem **277**(20): 18046-52.

- Park, A. R., S. K. Cho, et al. (2001). "Interaction of the Arabidopsis receptor protein kinase Wak1 with a glycine-rich protein, AtGRP-3." J Biol Chem **276**(28): 26688-93.
- Parks, W. T., D. B. Frank, et al. (2001). "Sorting nexin 6, a novel SNX, interacts with the transforming growth factor-beta family of receptor serine-threonine kinases." J Biol Chem **276**(22): 19332-9.
- Phizicky, E. M. and S. Fields (1995). "Protein-protein interactions: methods for detection and analysis." Microbiol Rev **59**(1): 94-123.
- Pitchford, S., K. De Moor, et al. (1995). "Nerve growth factor stimulates rapid metabolic responses in PC12 cells." Am J Physiol **268**(4 Pt 1): C936-43.
- Polisensky, D. H. and J. Braam (1996). "Cold-shock regulation of the Arabidopsis TCH genes and the effects of modulating intracellular calcium levels." Plant Physiol **111**(4): 1271-9.
- Rapoza, M. P. and R. E. Webster (1993). "The filamentous bacteriophage assembly proteins require the bacterial SecA protein for correct localization to the membrane." J Bacteriol **175**(6): 1856-9.
- Robinson, D. R., Y. M. Wu, et al. (2000). "The protein tyrosine kinase family of the human genome." Oncogene **19**(49): 5548-57.
- Russinova, E., J. W. Borst, et al. (2004). "Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1)." Plant Cell **16**(12): 3216-29.
- Samuel, M. A., Y. T. Chong, et al. (2009). "Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in Brassica and Arabidopsis stigmas intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex." Plant Cell **21**(9): 2655-71.
- San Jose, E., A. Benguria, et al. (1992). "Calmodulin inhibits the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase." J Biol Chem **267**(21): 15237-45.
- Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **103**(2): 211-25.
- Schlessinger, J. (2003). "Signal transduction. Autoinhibition control." Science **300**(5620): 750-2.
- Schlessinger, J. and M. A. Lemmon (2003). "SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling." Sci STKE **2003**(191): RE12.
- Schopfer, C. R., M. E. Nasrallah, et al. (1999). "The male determinant of self-incompatibility in Brassica." Science **286**(5445): 1697-700.

- Shah, K., E. Russinova, et al. (2002). "The Arabidopsis kinase-associated protein phosphatase controls internalization of the somatic embryogenesis receptor kinase 1." Genes Dev **16**(13): 1707-20.
- Shah, K., J. Vervoort, et al. (2001). "Role of threonines in the Arabidopsis thaliana somatic embryogenesis receptor kinase 1 activation loop in phosphorylation." J Biol Chem **276**(44): 41263-9.
- Shear, J. B., H. A. Fishman, et al. (1995). "Single cells as biosensors for chemical separations." Science **267**(5194): 74-7.
- Sheen, J. (2001). "Signal transduction in maize and Arabidopsis mesophyll protoplasts." Plant Physiol **127**(4): 1466-75.
- Shenoy, S. K., M. T. Drake, et al. (2006). "beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor." J Biol Chem **281**(2): 1261-73.
- Sherwood, E. R., D. L. Williams, et al. (1986). "Comparison of the in vitro cytolytic effect of hepatic, splenic and peritoneal macrophages from glucan-treated mice on sarcoma M5076." Methods Find Exp Clin Pharmacol **8**(3): 157-61.
- Shiba, H., S. Takayama, et al. (2001). "A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen S-specificity in the self-incompatibility of Brassica species." Plant Physiol **125**(4): 2095-103.
- Shiu, S. H. and A. B. Bleecker (2001). "Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling." Sci STKE **2001**(113): RE22.
- Shiu, S. H. and A. B. Bleecker (2001). "Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10763-8.
- Singh, S. M. and A. K. Panda (2005). "Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins." J Biosci Bioeng **99**(4): 303-10.
- Stanchev, B. S., J. Doughty, et al. (1996). "Cloning of PCP1, a member of a family of pollen coat protein (PCP) genes from Brassica oleracea encoding novel cysteine-rich proteins involved in pollen-stigma interactions." Plant J **10**(2): 303-13.
- Stein, J. C., R. Dixit, et al. (1996). "SRK, the stigma-specific S locus receptor kinase of Brassica, is targeted to the plasma membrane in transgenic tobacco." Plant Cell **8**(3): 429-45.
- Stein, J. C., B. Howlett, et al. (1991). "Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of Brassica oleracea." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(19): 8816-20.

- Stein, J. C. and J. B. Nasrallah (1993). "A plant receptor-like gene, the S-locus receptor kinase of *Brassica oleracea* L., encodes a functional serine/threonine kinase." Plant Physiol **101**(3): 1103-6.
- Stone, S. L., E. M. Anderson, et al. (2003). "ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen." Plant Cell **15**(4): 885-98.
- Stone, S. L., M. Arnoldo, et al. (1999). "A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants." Science **286**(5445): 1729-31.
- Stryer, L. (1981). "Rapid motions in protein molecules." Biochem Soc Symp(46): 39-55.
- Sun, H., Z. Chen, et al. (1997). "The juxtamembrane, cytosolic region of the epidermal growth factor receptor is involved in association with alpha-subunit of Gs." J Biol Chem **272**(9): 5413-20.
- Suzuki, T., M. Kusaba, et al. (2000). "Characterization of *Brassica* S-haplotypes lacking S-locus glycoprotein." FEBS Lett **482**(1-2): 102-8.
- Takasaki, T., K. Hatakeyama, et al. (2000). "The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma." Nature **403**(6772): 913-6.
- Takayama, S. and A. Isogai (2003). "Molecular mechanism of self-recognition in *Brassica* self-incompatibility." J Exp Bot **54**(380): 149-56.
- Tantikanjana, T., M. E. Nasrallah, et al. (1993). "An alternative transcript of the S locus glycoprotein gene in a class II pollen-recessive self-incompatibility haplotype of *Brassica oleracea* encodes a membrane-anchored protein." Plant Cell **5**(6): 657-66.
- Taylor, S. S. and E. Radzio-Andzelm (1994). "Three protein kinase structures define a common motif." Structure **2**(5): 345-55.
- Teis, D., W. Wunderlich, et al. (2002). "Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction." Dev Cell **3**(6): 803-14.
- Tonks, N. K. and B. G. Neel (2001). "Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases." Curr Opin Cell Biol **13**(2): 182-95.
- Trotochaud, A. E., T. Hao, et al. (1999). "The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein." Plant Cell **11**(3): 393-406.
- Vanoosthuyse, V., G. Tichtinsky, et al. (2003). "Interaction of calmodulin, a sorting nexin and kinase-associated protein phosphatase with the *Brassica oleracea* S locus receptor kinase." Plant Physiol **133**(2): 919-29.

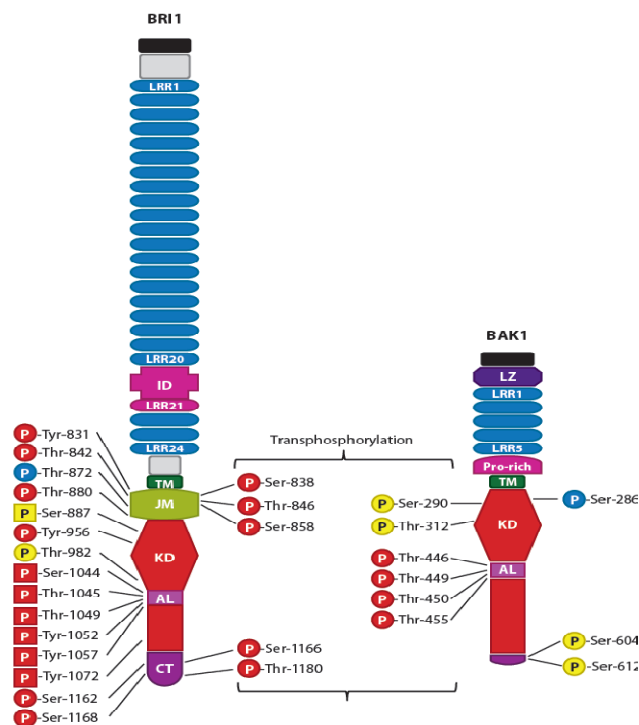
- Veron, M., E. Radzio-Andzelm, et al. (1994). "Protein kinases share a common structural motif outside the conserved catalytic domain." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **40**(5): 587-96.
- Vert, G. and J. Chory (2006). "Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling." Nature **441**(7089): 96-100.
- Vert, G., J. L. Nemhauser, et al. (2005). "Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 177-201.
- Wang, W., Y. Yang, et al. (2003). "Synleurin, a novel leucine-rich repeat protein that increases the intensity of pleiotropic cytokine responses." Biochem Biophys Res Commun **305**(4): 981-8.
- Wang, X. and J. Chory (2006). "Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane." Science **313**(5790): 1118-22.
- Wang, X., M. B. Goshe, et al. (2005). "Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase." Plant Cell **17**(6): 1685-703.
- Wang, X., X. Li, et al. (2005). "Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1." Dev Cell **8**(6): 855-65.
- Warren, C. M. and R. Landgraf (2006). "Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control." Cell Signal **18**(7): 923-33.
- Wells, A. (1999). "EGF receptor." Int J Biochem Cell Biol **31**(6): 637-43.
- Wells, A., K. Gupta, et al. (1998). "Epidermal growth factor receptor-mediated motility in fibroblasts." Microsc Res Tech **43**(5): 395-411.
- Wengier, D., I. Valsecchi, et al. (2003). "The receptor kinases LePRK1 and LePRK2 associate in pollen and when expressed in yeast, but dissociate in the presence of style extract." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(11): 6860-5.
- Williams, R. W., J. M. Wilson, et al. (1997). "A possible role for kinase-associated protein phosphatase in the Arabidopsis CLAVATA1 signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10467-72.
- Wybenga-Groot, L. E., B. Baskin, et al. (2001). "Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region." Cell **106**(6): 745-57.

- Xu, W., M. M. Purugganan, et al. (1995). "Arabidopsis TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase." Plant Cell **7**(10): 1555-67.
- Young, R. A. and R. W. Davis (1983). "Efficient isolation of genes by using antibody probes." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(5): 1194-8.
- Zurek, D. M., D. L. Rayle, et al. (1994). "Investigation of Gene Expression, Growth Kinetics, and Wall Extensibility during Brassinosteroid-Regulated Stem Elongation." Plant Physiol **104**(2): 505-513.



# Annexe I

Structure détaillé du récepteur BRI1 d'après Vert et al (2005).



## Annexe II

**Tableau récapitulatif des vecteurs utilisés dans ce mémoire.**

<b>Vecteur</b>	<b>Gène de résistance</b>	<b>Longueur</b>
<b>pZeo</b>	Zeocine	3800 pb
<b>pBlueScriptII</b>	Ampiciline	3000 pb
<b>pMDC32</b>	Hygromycine/Kanamycine	11752 pb
<b>pMDC83</b>	Hygromycine/Kanamycine	12513 pb
<b>pMDC162</b>	Hygromycine/Kanamycine	12884 pb

